Generierung und Charakterisierung von konditionalen *knock-outs* des Spleißfaktors *Sfrs10* im Mausmodell

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Ylva Christine Mende
aus Köln

Köln 2008

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Humangenetik der RHEINISCHEN FRIEDRICH-WILHELMS-UNIVERSITÄT BONN und am Institut für Humangenetik der UNIVERSITÄT ZU KÖLN angefertigt. Arbeiten an Zellkulturen wurden teilweise am Institut für Genetik der UNIVERSITÄT ZU KÖLN durchgeführt. Ein Teil der immunhistologischen Analysen wurde am Institut für Anatomie II der UNIVERSITÄT ZU KÖLN vorgenommen.

Berichterstatter/in: Prof. Dr. Brunhilde Wirth
Prof. Dr. Thomas Wiehe

Tag der letzten mündlichen Prüfung: 23. Oktober 2008

meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

Der Spleißfaktor SFRS10 (*splicing **f**actor arginine(**R**)-serin(**S**)-rich **10***) bindet RNA Sequenz-spezifisch und ist an der Kontrolle des prä-mRNA-Spleißens (siehe 1.1) sowie an alternativen Spleißprozessen (1.2) beteiligt. Das Protein gehört zu der Familie der SR-*related*-Spleißfaktoren (siehe 1.3) und agiert bei der Selektion von Spleißstellen in Abhängigkeit von seiner Konzentration (Beil et al. 1997; Nayler et al. 1998).

Mitarbeiter unserer Arbeitsgruppe konnten erstmals zeigen, dass SFRS10 – konzentrationsabhängig – das Spleißmuster des *SMN2* zu revertieren vermag, so dass von diesem Gen deutlich mehr Volllänge(VL)-Transkripte als alternativ gespleißte *SMNΔ7*-Transkripte, denen Exon 7 fehlt, generiert werden. Dies führt zu einem Anstieg von funktionellem SMN-Protein. SFRS10 ist sowohl für das korrekte Spleißen des Exons 7 von *SMN2* als auch von *SMN1* verantwortlich (Hofmann et al. 2000; Hofmann and Wirth 2002) (siehe 1.5.4). Der funktionelle Verlust des *SMN1*-Gens verursacht die spinale Muskelatrophie (SMA), wobei der Schweregrad dieser Erkrankung mit der *SMN2*-Kopienanzahl korreliert. Die Modulation des *SMN2*-Spleißens ist daher von besonderem Interesse für therapeutische Ansätze der SMA (Wirth et al. 2006b) (siehe auch 1.5). Über den geschilderten Kontext ist SFRS10 in den Fokus unseres Interesses gelangt. Da wenig über das Wirkungsspektrum des Proteins in *Mammalia* bekannt war, sollten im Rahmen der folgenden Untersuchungen diese Funktionen beleuchtet und über die Generierung und Charakterisierung adäquater Mausmodelle umgesetzt werden.

Da SFRS10 sowohl an generellen Spleißprozessen als auch bei alternativen Spleißvorgängen beteiligt ist, sollen im Folgenden die Spleißreaktion und Prozesse des alternativen Spleißens erläutert werden.

1.1 Die Spleißreaktion

Die Exons der meisten eukaryotischen Gene werden von langen, nicht-codierenden intronischen Sequenzen unterbrochen, die im primären Transkript zunächst erhalten bleiben (Newman 1994; Sharp 1988). Diese prä-mRNA liegt im Nucleus als heterogener Partikel (***h**eterogenous **n**uclear RNA*; hnRNA) komplexiert mit Proteinen vor (***h**eterogenous **n**uclear **r**ibonucleo **p**roteins*; hnRNPs) und wird co-transkriptionell prozessiert, bevor sie als reife mRNA in das Cytoplasma transportiert und schließlich translatiert wird. Die RNA-Prozessierung umfasst das *capping* – eine 5'-Modifikation der naszierenden RNA mit einem methylierten Guanosintriphosphat –, die Polyadenylierung am 3'-Ende der mRNA und das Spleißen. Bei diesem werden die intronischen Sequenzen entfernt und die Exons zu einem funktionellen Transkript

ligiert. Für die korrekte Spleißreaktion sind konservierte Konsensussequenzen an den Exon-Intron-Grenzen und im Intron selbst von Bedeutung – die 5'-Spleißstelle, der *branchpoint* („Verzweigungstelle"), ein Polypyrimidin-[Poly(A)-]Trakt und die 3'-Spleißstelle (Reed 1989; Senapathy et al. 1990; Smith et al. 1989; Stephens and Schneider 1992).

Die Spleißreaktion findet in einem Ribonucleoprotein-Komplex – dem Spleißosom – statt. Das Spleißosom besteht aus den fünf nucleären Riboproteinen (***s****mall* ***n****uclear* ***r****ibonucleo****p****roteins;* snRNPs) U1, U2, U4, U5, U6 sowie zahlreichen nicht-snRNP-Proteinen (Rappsilber et al. 2002; Young et al. 2002a). Alle snRNPs besitzen eine charakteristische ringförmige Kernstruktur, bestehend aus sieben Sm-Proteinen (SmB/B', SmD1-D3, SmE, SmF, SmG). Jedes einzelne snRNP ist darüber hinaus aus kurzen RNA-Sequenzen von 100-300 bp Länge und verschiedenen Proteinen zusammengesetzt, die eine charakteristische Haarnadelstruktur und somit Domänen für die Interaktionen im Spleißosom bilden. Dabei ist die RNA-Protein-Komposition für jedes snRNP spezifisch. Die Zusammenlagerung des Spleißosoms, seine Struktur und die Spleißreaktion werden über RNA-RNA-, RNA-Protein- und Protein-Protein-Interaktionen vermittelt (Collins and Guthrie 2000).

Der Spleißprozess lässt sich in zwei Reaktionen unterteilen: 1. die Zusammenlagerung des Spleißosoms unter Erkennung der intronischen Konsensussequenzen und 2. die Spaltung und Ligation unter Änderung der Struktur der Substrat-RNA (Abbildung 1.1).

Das Spleißosom katalysiert die zweite Reaktion in zwei aufeinander folgenden Umesterungen an den Exon-/Intron-Grenzen. Zunächst greift die 2'-Hydroxylgruppe eines Adenins des *branchpoints* als Nucleophil die 5'-Spleißstelle an, so dass eine 2'5'-Phosphodiesterbindung ausgebildet wird und das Intron und das 3'-Exon eine Lariatstruktur bilden. Die freie 3'OH-Gruppe des abgespaltenen 5'-Exons greift nun als Nucleophil die Phosphodiesterbindung der 3'-Spleißstelle an, so dass eine neue Phosphodiesterbindung zwischen dem 5'- und dem 3'-Exon gebildet und das Intron enfernt wird (Pasman and Garcia-Blanco 1996) (Abbildung 1.1).

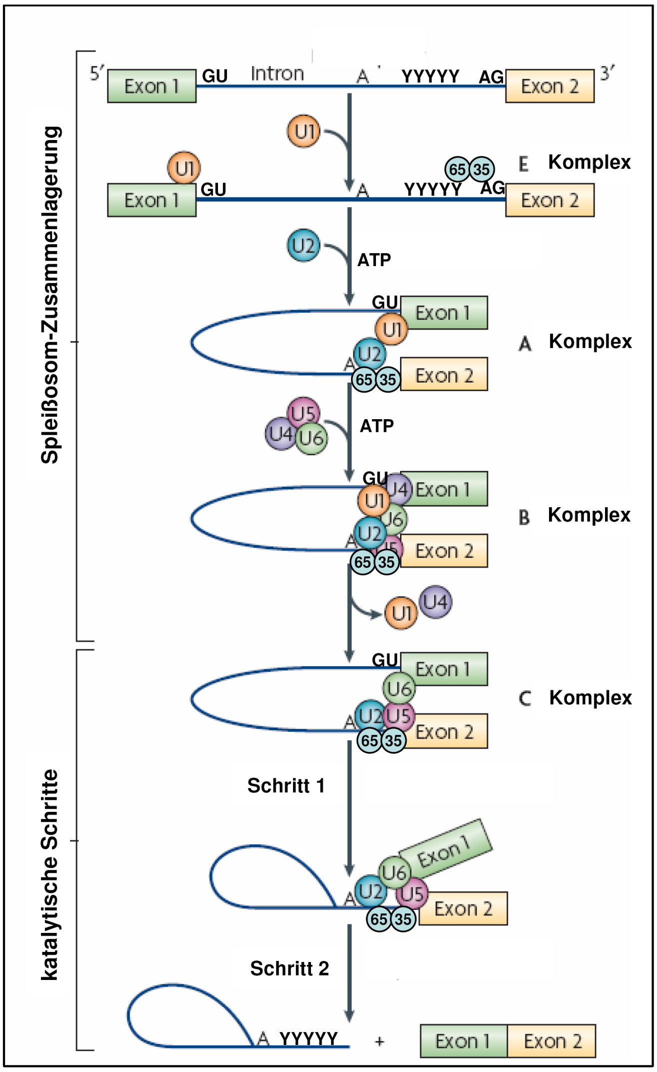


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Spleißreaktion; Formation des **E-Komplexes**: U1-snRNP bindet die 5'-Spleißstelle, U2AF^{65} und U2AF^{35} binden den Poly-Pyrimidintrakt in der Nähe der 3'-Spleißstelle. Der **A-Komplex** bildet sich über Bindung von U2-snRNP an den *branchpoint*; der tri-snRNP-U5/U6·U4 bindet die 5'-Spleißstelle und bildet so den **B-Komplex**. Über Konformationsänderungen, bei denen U1- und U4-snRNP aus dem Komplex entlassen werden, wird der katalytisch aktive **C-Komplex** gebildet. Während der **katalytischen Schritte** des Spleißens wird über zwei Umesterungen das Intron entfernt; die Exons werden schließlich ligiert. A = Adenosin im *branchpoint*; YYYYY = Polypyrimidin-Trakt; GU = 5'Spleißstelle; AG = 3'-Spleißstelle; 65 = U2AF^{65}; 35 = U2AF^{35}; [modifiziert nach (Moorhead et al. 2007)].

Die Zusammenlagerung des Spleißosoms erfolgt schrittweise: Zunächst bindet U1-snRNP an die 5'-Spleißstelle. Die SR-*related*-Proteine (siehe 1.3) U2AF^{65} und U2AF^{35} (U2 *auxilary factor*) binden den Polypyrimidintrakt im Intron bzw. die 3'-Spleißstelle und bilden ein Heterodimer (Ma et al. 1999; Merendino et al. 1999; Zamore et al. 1992; Zorio and Blumenthal 1999). Dieser RNA-Protein-Komplex wird als E-Komplex (*early*) bezeichnet (Brzustowicz et al. 1994). In einem ATP-abhängigen Prozess bindet U2-snRNP nun den *branchpoint* und bildet so den A-Komplex (Furman and Glitz 1995; Kramer 1996). Der tri-snRNP-U4/U6·U5 lagert sich in einem ATP-abhängigen Prozess an die 5'-Spleißstelle, was zur Formation des B-Komplexes

führt (Andreadis et al. 1992; Umen and Guthrie 1995a, 1995b). Dieser durchläuft Konformationsänderungen, bei denen die Interaktionen zwischen RNA und Proteinen umstrukturiert und die snRNPs-U1 und -U4 aus dem Komplex entlassen werden. Dies führt zur Bildung des katalytisch aktiven C-Komplexes, in welchem die eigentliche Spleißreaktion stattfindet (Jurica and Moore 2003; Yean and Lin 1991). Es gibt Hinweise, dass sich das Spleißosom auch unabhängig von der Substrat-RNA zusammenlagern kann (Nilsen 2002). Ferner haben De-/Phosphorylierungen der im Spleißprozess involvierten Proteine eine wichtige Bedeutung bei der Zusammenlagerung des Spleißosoms und beim katalytischem Spleißprozess selbst (Moorhead et al. 2007).

Bei einer fehlerhaften Spleißreaktion kann es zu verschiedenen Krankheitsbildern kommen. Diese Defekte können wegen *cis*-Mutationen verursacht werden, die konstitutive oder alternative Spleißstellen zerstören, oder wegen *trans*-Mutationen, welche die Spleißosom-Zusammenlagerung oder die Spleißreaktion selbst stören [Review (Faustino and Cooper 2003; Wang and Cooper 2007)].

Abbildung 1.1 gibt eine Übersicht der Vorgänge bei der Spleißosom-Zusammenlagerung und der Spleißreaktion.

1.2 Alternatives Spleißen

Über die Selektion verschiedener Spleißstellen in der prä-mRNA können beim alternativen Spleißen von einem Gen multiple mRNAs generiert werden. (Duncan et al. 1995; Eissa et al. 1996). Eine Vielzahl der menschlichen Gene (bis 59%) scheint alternativ gespleißt zu werden, so dass der Mechanismus zu einer enormen Erhöhung der Proteindiversität führt – von einem Genom mit ~25.000 Genen wird ein Proteom von 90.000 bis $1x10^6$ Proteinen generiert (Harrison et al. 2002; Hodges et al. 2002; Modrek et al. 2001).

Die Selektion alternativer Spleißstellen wird über kooperative Aktionen verschiedener Spleißfaktoren reguliert (Roberts and Smith 2002; Smith and Valcarcel 2000). Die korrekte Exon-Erkennung basiert hierbei auf fein abgestimmten Wechselwirkungen zwischen antagonisierenden Spleißfaktoren (Cartegni et al. 2006; Charlet et al. 2002; Mayeda et al. 1994). Mit der Selektion unterschiedlicher Promotoren, alternativer Exons oder Terminationscodons können zahlreiche alternativ gespleißte Transkripte über verschiedener Mechanismen generiert werden. So kann die Nutzung alternativer Promotoren zu der Generierung von mRNAs mit Unterschieden im 5'-nicht-translatierten Bereich bzw. von Proteinen mit unterschiedlichen N-Termini führen (Abbildung 1.2A). Beim alternativen Spleißen interner Exons (Abbildung 1.2B) können alternative Kassettenexons (Abbildung 1.2B2) aber auch alternative 5'- oder 3'-Spleißstellen

(Abbildung 1.2B3, 4) genutzt werden. Ferner können Introns beibehalten werden (Abbildung 1.2B5), oder es kann von zwei oder mehreren möglichen Exons nur eines inseriert werden („gegenseitiger Ausschluss“; Abbildung 1.2B6). Auf codierender Ebene kann dies zu Insertionen oder Deletionen von Aminosäuren, zu einer Leserasterverschiebung oder auch zu vorzeitigen Stopp-Codons führen. Hierbei kann es zur Generierung von verkürzten, zum Teil auch funktionslosen Proteinen oder auch zu der *nonsense mediated decay*-vermittelten Degradierung der mRNA kommen, wenn das Stopp-Codon mehr als 50 bp vor der letzten Exon-Exon-Grenze liegt.

Der 3’-Terminus einer mRNA wird mit einer gerichteten Spaltung und einer nachfolgenden Polyadenylierung determiniert (Proudfoot et al. 2002). Hierbei kann die Selektion alternativer terminaler Exons über die Kompetition zwischen der Spaltung an der *upstream* Poly(A)-Stelle und dem Spleißen an der *downstream* gelegenen 3’-Spleißstelle (Abbildung 1.2C7) zustande kommen, oder mit Kompetition einer 5’-Spleißstelle und einer Poly(A)-Stelle in einem *upstream* gelegenen terminalen Exon (Abbildung 1.2C8). So werden entweder mRNAs mit unterschiedlichen 3’-Bereichen generiert, die entweder im nicht-translatierten Bereich liegen oder schließlich zur Generierung von Proteinen mit unterschiedlichen C-Termini führen.

Die Selektion alternativer Spleißstellen ist komplex und unterliegt oftmals spezifischen Regulationsmechanismen, so dass die Spleißprozesse je nach Zelltyp, Entwicklungsstadium und Geschlecht oder als Antwort auf externe Stimuli moduliert werden. Hierbei haben auch die Zugänglichkeit der Spleißstellen, die über die Konformation des RNA-Substrates determiniert wird, und die Zusammensetzung von Spleißfaktoren in der Zelle eine entscheidende Bedeutung [Reviews (Black 2000; Faustino and Cooper 2003; Smith and Valcarcel 2000)].

Abbildung 1.2 zeigt mögliche Mechanismen des alternativen Spleißens.

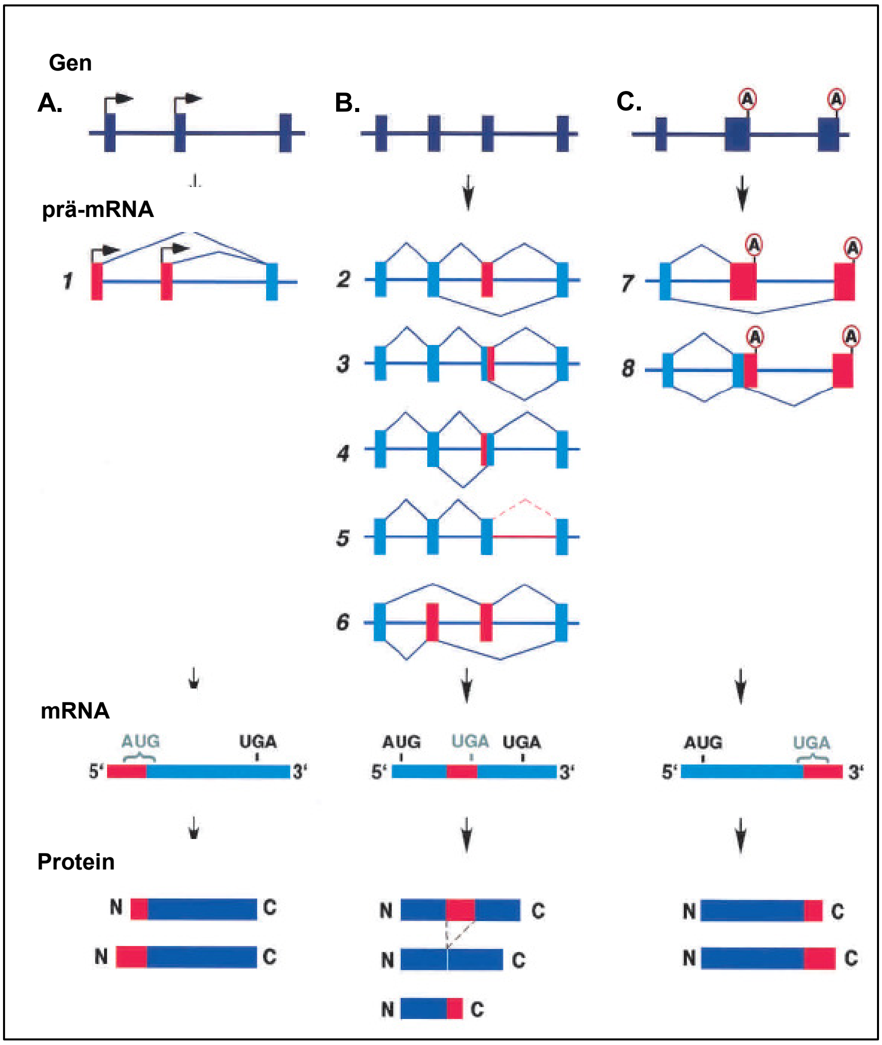


Abbildung 1.2: Mechanismen des alternativen Spleißens; **A.** alternative Promotornutzung: Selektion von multiplen Start-Exons führt zu Variabilitäten im 5'-Bereich der mRNA (**1**), so dass Proteine mit diversen N-Termini generiert werden können. **B.** alternatives Spleißen interner Exons über Selektion: **2**. alternativer Kassettenexons, **3**. alternativer 5'-Spleißstellen, **4.** alternativer 3'-Spleißstellen, **5.** alternativem Introneinschluss, **6.** „gegenseitigen Ausschluss" von Exons. **C.** Selektion alternativer terminaler Exons mittels: **7.** Kompetition der Spaltung der *upstream* Poly(A)-Stelle und Spleißen an der *downstream* 3'-Spleißstelle oder **8**. über Kompetition einer 5'-Spleißstelle und einer Poly(A)-Stelle in einem *upstream*-terminalem Exon; Pfeile deuten Promotoren, Boxen Exons an; Linien indizieren die Verbindung von Exons; rot = Variabilitäten in mRNA oder Proteinen; N = N-Terminus; C = C-Terminus; [aus (Faustino and Cooper 2003)].

1.3 SR- und SR-*related*-Proteine

Die beschriebenen, für das Spleißen essentiellen Sequenzelemente (5'-/3'-Spleißstelle, *branch-point,* Poly(A)-Trakt; siehe 1.1) sind kurz und degeneriert (Burset et al. 2000), so dass zusätzliche Elemente für die korrekte Exonerkennung notwendig sind. Diese Sequenzen kommen sowohl in exonischen als auch in intronischen Bereichen vor, können inhibitorische wie auch stimulierende Wirkungen auf den Einschluss eines Exons haben und werden deshalb auch als ***e****xonic/****i****ntronic* ***s****plicing* ***e****nhancers/****s****ilencers* bezeichnet (ESE/ISE; ESS/ISS) (Blencowe 2000;

Ladd and Cooper 2002). Solche *cis*-Sequenzelemente werden von *trans*-Faktoren wie hnRNPs, SR- und SR-*related*-(SRr-)Proteinen erkannt und gebunden (Dreyfuss et al. 2002). Somit spielen neben den beschriebenen snRNP-Komponenten des Spleißosoms (1.1) weitere Proteine bei seiner Zusammenlagerung und bei der katalytischen Spleißreaktion eine Rolle (Madhani and Guthrie 1994; Moore and Sharp 1993). Proteine aus der Gruppe der hnRNPs (***h****eterogenous* ***n****uclear* ***r****ibonucleo* ***p****roteins*) assoziieren schon früh während der Transkription mit dem primären Transkript (Dreyfuss et al. 1993; Weighardt et al. 1996). Eine weitere bedeutende Stellung unter diesen nicht-snRNP Spleißfaktoren nehmen die SR-Proteine [Review (Graveley 2000)] und SR-*related*-(SRr-)Proteine ein [Review (Blencowe et al. 1999)]. Diese *trans*-Faktoren gehören zu einer Familie hoch konservierter Spleißproteine, denen sowohl bei konstitutiven als auch bei alternativen Spleißprozessen in *Metazoa* eine wichtige Funktion zukommt (Fu 2004; Graveley 2000; Smith and Valcarcel 2000). Ursprünglich wurde die Familie der SR-Proteine als eine Gruppe von Proteinen identifiziert, die SR-defizitäre cytoplasmatische S100-Extrakte *in vitro* zu komplementieren vermochte (Mayeda and Krainer 1992; Tarn and Steitz 1994; Zahler 1999). SR-Proteine gelten als essentielle Spleißfaktoren, während SRr-Proteine nicht-essentielle Spleißfaktoren sind und eher regulatorische und modulierende als konstitutive Funktionen im Spleißprozess erfüllen (Tacke et al. 1998). Für alle SR- und SRr-Proteine wurde eine Aktivierung von Spleißprozessen nachgewiesen (Kramer 1996). Typischerweise sind Proteine der SR-Familie in subnucleären Strukturen – den *speckles* – angereichert (Spector 1993). Die Spleißfaktoren liegen in diesen *speckles* meist in inaktiver Form vor und verlassen sie über periphere Ausläufer zu transkriptionell aktiven Genen (Misteli et al. 1997). Das erste in *Mammalia* charakterisierte SR-Protein war SF2/ASF (***s****plicing* ***f****actor 2/****a****lternative* ***s****plicing* ***f****actor*), welches eine konzentrationsabhängige Selektion der 5'-Spleißstelle in HeLa-Kernextrakten zeigte (Ge and Manley 1990; Ge et al. 1991; Krainer et al. 1991).

SR- und SRr-Proteine haben eine charakteristische Struktur mit ein oder mehreren C-terminalen Serin-/Arginin-reichen (SR oder RS) Domänen variabler Größe und ein bis zwei N-terminalen RNA-Erkennungsmotiven (***RNA-r****ecognition* ***m****otif*; RRM). Mit der RRM werden kurze degenerierte Sequenzmotive (ESEs; ESSs; ISEs; ISS) im RNA-Substrat erkannt und gebunden – das RRM determiniert somit die Spezifität des Proteine. Die Degeneration der Erkennungsmotive ist hierbei von Bedeutung, da die SR- und SRr-Proteine damit z.B. auch überlappende Spezifitäten für RNA-Substrate aufweisen und auf diese Weise vielfältig im Spleißprozess agieren können (Blencowe 2000). Die SR-Domänen der Proteine dienen der Interaktion mit anderen Spleißfaktoren, die sowohl für die Formation des Spleißosoms als auch für die Selektion von Spleißstellen von Bedeutung sind (Graveley 2000; Tacke and Manley 1999). Die

Potenz und somit die Qualität von RS-Domänen variiert mit der Quantität der Arginin-Serin-Dipeptide (Graveley and Maniatis 1998). Die RS-Domänen verschiedener Spleißfaktoren können zwischen verschiedenen SR-Proteinen substituiert werden, so dass bei gleicher RNA-Spezifität andere Protein-Interaktionen ausgebildet werden (Chandler et al. 1997; Wang et al. 1998). Die Proteine bleiben auch bei Fusion mit einem anderen RRM funktionell (Graveley and Maniatis 1998). Dies wurde z.B. für den *Drosophila melanogaster* SRr-Spleißfaktor Tra2 (1.4.1) gezeigt (Dauwalder and Mattox 1998). Die RRM- und RS-Domänen agieren somit unabhängig voneinander. Die Serin-Reste in den RS-Domänen sind phosphorylierbar – bei diesem Prozess sind SR-Protein-Kinasen – wie z.B. die Familie der CDC-*like*-Kinasen (CLK) – von Bedeutung. Der Phosphorylierungs-Status der SR- und SRr-Proteine moduliert die Proteinaktivität und hat somit auch eine Bedeutung bei alternativen Spleißprozessen. Die Phosphorylierung kann hierbei die Selektion alternativer Exons entweder verringern oder erhöhen, was letztlich wegen einer Inhibition bzw. Förderung von Protein-Protein-Interaktionen begründet sein dürfte. Spezifische hnRNPs können die Funktion von SR-Proteinen antagonisieren, so dass auch die Balance zwischen den beiden Proteinfamilien eine kritische Rolle in der Selektion von Spleißstellen zu spielen scheint (Mayeda and Krainer 1992; Mayeda et al. 1994). Die Selektion von Spleißstellen ist also sowohl von der Zusammensetzung und Konzentration an SR-/SRr-Proteinen als auch von Kinasen/Phosphatasen in der Zelle sowie von Affinitäten und Interaktionen mit anderen Proteinen abhängig, die auch antagonistisch sein können (Cowper et al. 2001; Hanamura et al. 1998; Misteli et al. 1997).

1.4 Der SRr-Spleißfaktor SFRS10

Das SRr-Protein SFRS10 reguliert – wie auch andere Spleißfaktoren – Sequenz-spezifisch die Selektion alternativer Spleißstellen in Abhängigkeit von seiner Konzentration (Tacke et al. 1998). Das Ortholog Transformer-2 (Tra2) wurde erstmals als Spleißfaktor der geschlechts-determinierenden Kaskade in *Drosophila melanogaster* beschrieben, die über alternative Spleißprozesse reguliert wird (Baker 1989; Nagoshi et al. 1988). In dieser Kaskade reguliert das Protein zusammen mit Transformer (Tra) das Spleißen einer weiblich-spezifischen mRNA-Form von *doublesex* (*dsx*). Der Einschluss des *dsx*-Exons 4 resultiert in der Expression weiblich-spezifischer Gene und in der Repression männlich-spezifischer Gene (Tian and Maniatis 1993). Zwei Isoformen des Proteins ($Tra2^{226}$/$Tra2^{179}$) unterliegen autoregulativen Prozessen (Mattox and Baker 1991) und haben eine Bedeutung bei der Spermatogenese und männlich-spezifischen Verhaltensmustern (Belote and Baker 1983). Die Deletion von Tra2 in *Drosophila*

führt zu der Transformation von Weibchen in phänotypische Männchen, die jedoch steril sind (Baker and Ridge 1980).

1.4.1 Das humane SFRS10-Gen, -Transkript und -Protein

Das humane Ortholog zu Tra2 wird entsprechend seiner strukturellen Merkmale mit SFRS10 bezeichnet (*splicing **f**actor arginine(**R**)-serin(**S**)-rich **10***). In früheren Publikation wurde das Protein gemäß seines Orthologs in *Drosophila* auch hTra2-β benannt (***h**uman **T**ransformer-**2**-**B**eta*) (Beil et al. 1997) (Tabelle 1.1).

Das *SFRS10*-Gen ist auf Chromosom 3 (3q26.2-q27) lokalisiert und umfasst 10 Exons und 9 Introns, die sich auf einen Bereich von ~21 kb ausdehnen (Nayler et al. 1998). Die Exongröße variiert zwischen 10 bp (Exon 10) und 189 bp (Exon 4). Über alternative Spleißprozesse, alternative Polyadenylierung und alternative Promotornutzung werden vom *SFRS10*-Gen mindestens fünf verschiedene mRNA-Isoformen (*SFRS10-V1-5*) generiert, wobei lediglich *SFRS10-V1* und *-V3* tranlatiert werden (Abbildung 1.3). Ausgehend von einem Start-Codon in Exon 1 werden die längste und die kürzeste Isoform *SFRS10-V1* (Exons 1 und 3-10) und *-V2* (Exons 1-2) generiert. Bei *SFRS10-V3* und *-V4* folgen diesem Start-Codon *in frame* Stopp-Codons, so dass die ORFs dieser Isoformen von einem Start-Codon in Exon 4 ausgehen (Beil et al. 1997). Wegen eines Stopp-Codons in Exon 2 werden *SFRS10-V2* und *-V4* nicht translatiert und auch für *SFRS10-V5* konnte bisher kein Proteinprodukt nachgewiesen werden (Daoud et al. 1999; Nayler et al. 1998; Stoilov et al. 2004). Die Proteinvarianten SFRS10-V1 und -V3 weisen die charakteristische Struktur von SR-*related*-Spleißfaktoren auf, wobei das RRM des SFRS10-V1 von zwei RS-Domänen (RS1, RS2) flankiert wird, während SFRS10-V3 die erste RS-Domäne fehlt. Die RS-Domänen erlauben sowohl Interaktionen mit anderen Proteinen als auch Homomultimerisierungen (Beil et al. 1997; Nayler et al. 1998). Unter den SFRS10-Interaktionspartnern finden sich zahlreiche Spleißfaktoren wie z.B. SFRS4-6 und SFRS9. Das Protein weist eine glyzin- und eine tyrosinreiche Region auf. (Abbildung 1.3). RS1 wird von den Exons 3-4, das RRM von Exons 5-6 und die RS2 von den Exons 7 und 9 codiert. Die glyzinreiche Region, die RS2 unterbricht, wird von Exon 8 codiert (Nayler et al. 1998). *SFRS10-V1* wird ubiquitär exprimiert. Die stärkste Expressionsrate ist im Herzen, der Skelettmuskulatur, dem Pankreas und in neuronalen Geweben, eine mittlere in Nieren und in der Placenta und eine schwache in Leber und Lunge zu finden. SFRS10-V3 wird Gewebe-spezifisch und überwiegend in Leber, Gehirn, Testis und Nieren exprimiert. Das Protein ist in den für Spleißfaktoren typischen subnucleären *speckles* angereichert (Chen et al. 2003; Nayler et al. 1998).

SFRS10-V1 bindet ein Purin-reiches, stark degeneriertes RNA-Sequenzmotiv (Abbildung 1.3D), das häufiger in Exons, als in Introns gefunden wird und somit eine bedeutendere Rolle des Proteins in der Exon-Identifizierung suggeriert. Abbildung 1.3 verdeutlicht die genomische Organisation und Spleißvarianten des humanen *SFRS10*.

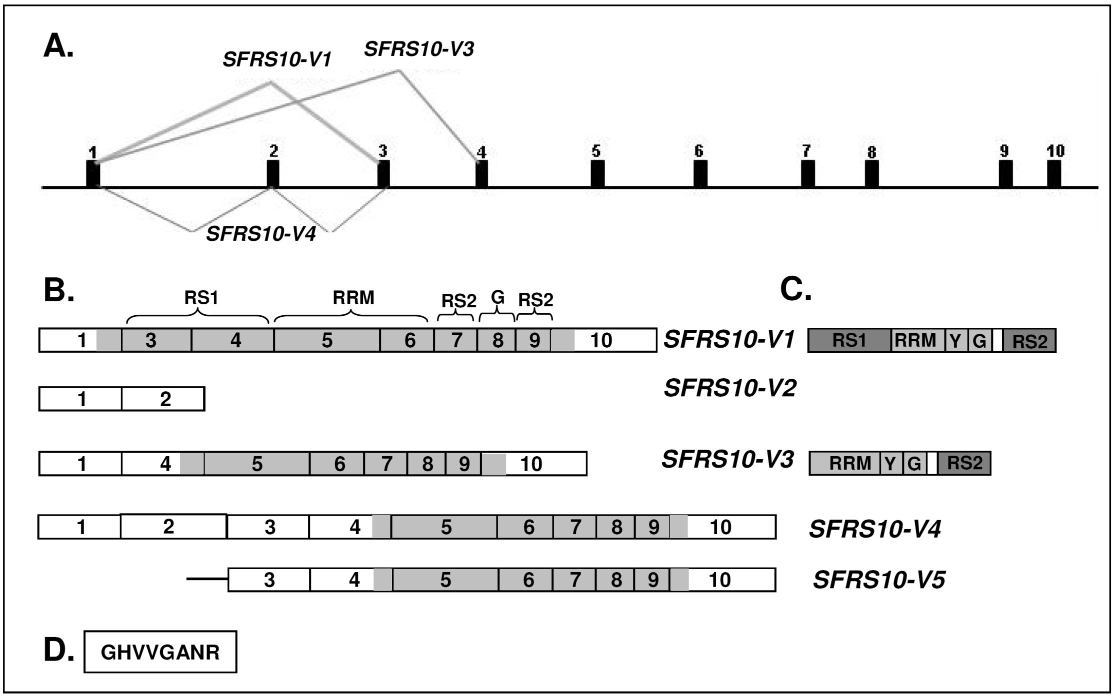
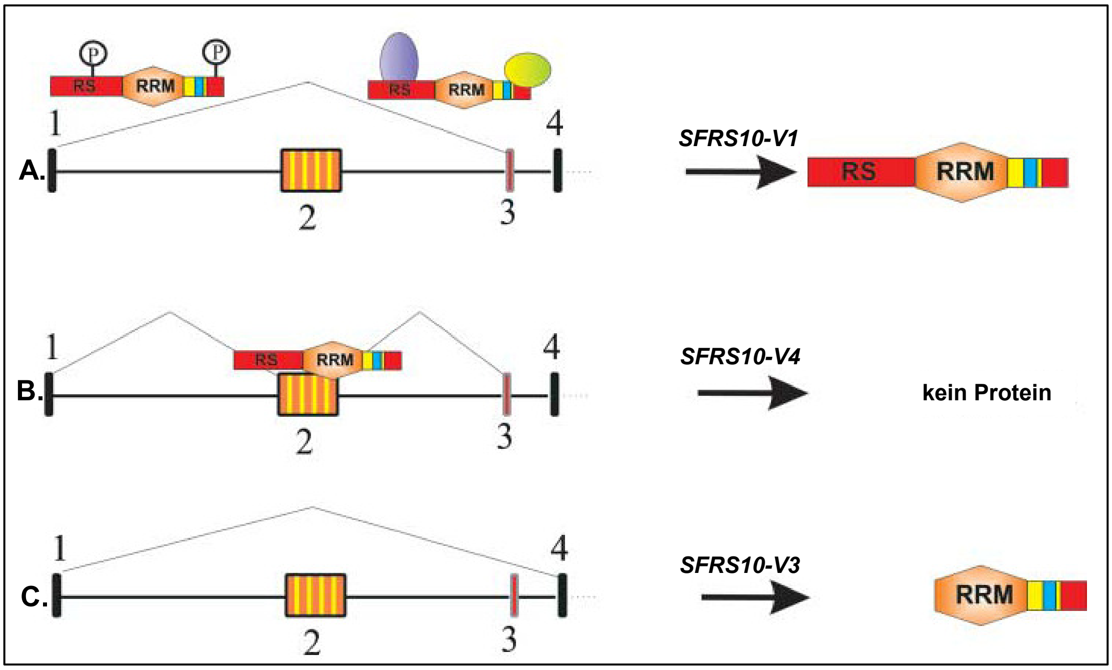


Abbildung 1.3: Genomische Organisation und Spleißvarianten des humanen *SFRS10*;
A. Genomische Organisation des *SFRS10*; 1-10 = Exons; alternative Spleißmuster von *SFRS10-V1, -V3, -V4* sind angedeutet; **B.** Spleißvarianten des *SFRS10*; ORF in grau. Die Domänen, die von den jeweiligen Exons codiert werden sind angedeutet. **C.** Proteinstruktur des SFRS10-V1 und –V3; RS = Arginin-/Serin-reiche Domäne; RRM = *RNA*-Bindedomäne; Y = tyrosinreiche Region; G = glyzinreiche Region; **D.** Konsensusmotiv für die Bindung von SFRS10; H = A/C/T, V = A/C/G, R = A/G; [modifiziert nach (Stoilov et al. 2004)].

Die Expression der unterschiedlichen SFRS10-Isoformen unterliegt autoregulatorischen Prozessen. SFRS10-V1 bindet vier ESEs in *SFRS10*-Exon 2 und fördert somit den Einschluss dieses Exons in die mRNA. Da *SFRS10*-Isoformen, die Exon 2 enthalten, nicht translatiert werden, reguliert SFRS10-V1 konzentrationsabhängig sein eigenes Level in der Zelle (Stoilov et al. 2004) (Abbildung 1.4). Die Regulation der *SFRS10*-Expression und dessen regulatorische Funktionen beim Spleißen unterliegen auch der Phosphorylierung der RS-Domänen des Proteins. Der Phosphorylierungsstatus des Proteins hat hierbei Einfluss auf seine Bindekapazitäten und seine zelluläre Lokalisation. So unterbindet z.B. die CLK2-abhängige Phosphorylierung von SFRS10-V1 dessen Bindung an *SFRS10*-Exon 2, in höheren Konzentrationen zusätzlich von Exon 3, was letztlich zur Deletion dieser Exons in der mRNA und somit zur Generierung von *SFRS10-V1* oder *-V3* führt (Stoilov et al. 2004). Die CLK2-abhängige SFRS10-V1-

Phosphorylierung inhibiert auch den Einschluss des Tau-Exons 10 (siehe auch 1.4.3) (Glatz et al. 2006). Für die Phosphatase-1-abhängige Dephosphorylierung von SFRS10-V1 hingegen wurde eine Inhibierung des SFRS10-vermittelten Einschluss von *SFRS10*-Exon 2, von *SMN2*-Exon 7 (1.5.4) und von anderen SFRS10-abhängigen Exons gezeigt (Novoyatleva et al. 2008). Eine Hyperphosphorylierung des Proteins scheint eine cytoplasmatische Lokalisation von SFRS10 zu bedingen (Daoud et al. 2002). Die Expression von SFRS10 wird ferner über externe Stimuli beeinflusst. So wurde in Astrocyten und in Gehirnarealen der Ratte nach einer induzierten Ischämie und anschließender Reoxygenierung eine erhöhte Expression von Sfrs10 gezeigt (Matsuo et al. 1995). Das murine Homolog wird in Makrophagen nach Stimulation mit Silica-Partikeln heraufreguliert (Segade et al. 1995). Nach Stimulation kultivierter T-Zellen wurde eine veränderte Expression der alternativen Spleißvarianten nachgewiesen (Beil et al. 1997). Abbildung 1.4 verdeutlicht die autoregulativen Mechanismen des SFRS10.



<u>Abbildung 1.4:</u> Autoregulation des SFRS10; A. Ist die SFRS10-V1-Konzentration gering, liegt das Protein hyperphosphoryliert vor oder ist über Protein-Interaktionen gebunden, bindet es die ESEs in Exon 2 nicht; dieses Exon wird deletiert und SFRS10-V1 generiert. **B.** Bei hohen SFRS10-Konzentrationen bindet das Protein die ESEs in Ex2, was zum Einschluss dieses Exons in die mRNA führt. *SFRS10*-Isoformen, die Ex2 enthalten, werden nicht translatiert. **C.** Die CLK2-vermittelte SFRS10-V1 Phosphorylierung inhibiert den Einschluss der Exons 2 und 3, so dass das trunkierte SFRS10-V3 generiert wird. [modifiziert nach (Stoilov et al. 2004)]

Neben der Bezeichnung SFRS10 sind zahlreiche Synonyme des Proteins bekannt. Tabelle 1.1 gibt eine Übersicht der Synonyme, genomischen Lokalisationen, Gengrößen, Transkriptgrößen der *SFRS10-V1*, Proteingrößen und Homologien zwischen den Spezies für das humane und murine SFRS10 sowie des Tra2 aus *Drosophila*.

Tabelle 1.1 Übersicht der Synonyme, genomischen Lokalisation, Gengrößen, ORF und Proteineigenschaften von SFRS10 verschiedener Spezies.

Spezies	**Mensch**	**Maus**	**Taufliege (*Drosophila melanogaster)***
Synonyme	hTra2-β1; SFRS10	Sig41; Silg41; Sfrs10	Tra2
genomische Lokalisation	Chromosom 3	Chromosom 16	Chromosom 2R
Gengröße	21.232 bp	20.197 bp	2349 bp
Transkript –*V1*	1934 bp/9 Exons	1499 bp/9 Exons	1228 bp/5 Exons
Aminosäuren	288	288	226
Molekulargewicht	33,7 kDa	33,7 kDa	27 kDa
	100% Identität auf Proteinebene		
	45% Identität auf Proteinebene		

1.4.2 Das murine Sfrs10

Das *SFRS10*-Homolog der Maus wurde ursprünglich in einer Makrophagen-cDNA-Bibliothek identifiziert. Die Makrophagen waren Silica-Partikeln ausgesetzt worden, um Gene zu identifizieren, die auf diesen externen Stimulus mit einer Heraufregulation der Expression reagierten. Auf Grund dessen wurde Sfrs10 auch mit Sig41 oder Silg41 bezeichnet (***s**ilica **i**nduced **g**en 41)* (Segade et al. 1995). In murinen Zellen konnten vier Transkripte (2,1 kb; 2 kb; 1,5 kb und 1,4 kb) identifiziert werden, die sich jedoch über Nutzung verschiedener Poly(A)-Signale ausschließlich in ihrem 3'UTR unterscheiden. Das 1,5 kb- und das 2,1 kb-Transkript werden ubiquitär mit besonders hohem Level in Uterus, Gehirn und Testis exprimiert. Hierbei weist das 2,1 kb-Transkript eine geringere Stabilität auf, so dass das kleinere Transkript dem *SFRS10-V1* zu entsprechen scheint (Segade et al. 1996). Eine hohe Expression des Proteins wurde in Testis gezeigt, so dass eine Funktion bei der Spermatogenese nicht ausgeschlossen werden kann (Venables et al. 2005). Das humane SFRS10 und das murine Sfrs10 zeigen auf Proteinebene eine 100%ige Identität, so dass von stark konservierten Funktionen des Spleißfaktors ausgegangen werden kann.

Das SFRS10-Homolog der Ratte RA301 wurde als stark exprimierter Faktor nach einer induzierten Ischämie identifiziert (siehe auch 1.4.1) (Matsuo et al. 1995).

1.4.3 SFRS10 im Kontext alternativer Spleißprozesse

SFRS10 gilt als nicht-essentieller Spleißfaktor, da das Protein die Deletion von essentiellen SR-Spleißfaktoren in konstitutiven Spleißprozessen nicht kompensieren kann (Tacke et al. 1998). Dem Protein wurde in zahlreichen alternativen Spleißprozessen eine Bedeutung zugewiesen. SFRS10 wird in Testis stark exprimiert, wo es mit RBMY (***R**NA-**b**inding **m**otif gene on*

*chromosome **Y***), hnRNP-G und hnRNP-GT (einer Testis-spezifischen Isoform von hnRNP-G) interagiert. Diese Spleißfaktoren sind an der nucleären RNA-Prozessierung während der Spermatogenese beteiligt (Venables et al. 2000). Zudem konnte in Testis eine Gewebe-spezifische Spleißisoform von HipK3, einer Kinase, nachgewiesen werden, die mit der Beteiligung von SFRS10 an einem alternativen Spleißprozess generiert wird (Venables et al. 2005). Dies weist auf eine Funktion des Spleißfaktors während der Spermatogenese hin.

Eine Beteiligung von SFRS10 wurde auch bei neuronal-spezifischen Spleißprozessen gezeigt. Eine erhöhte SFRS10-Expression in P19-Zellen hat z.B. Einfluss auf das Spleißen von FGF-2R-(***f**ibroblast **g**rowth **f**actor **2R***) und Glu-R B-(***glu**tamate **r**eceptor subunit **B***)Minigenen – zwei Faktoren, die während der neuronalen Differenzierung von Bedeutung sind (Chen et al. 2004a). Mit ansteigender SFRS10-Konzentration wird der Einschluss eines neuronal-spezifischen Exons (EN) der *clathrin light chain B* inhibiert, wobei eine Gewebe-spezifische Interaktion mit anderen SR-Proteinen wichtig zu sein scheint (Stamm et al. 1999).

Auch unter verschiedenen pathophysiologischen Bedingungen wurde als Resultat einer veränderten SFRS10-Konzentration eine veränderte Spleißstellenselektion nachgewiesen. So wurde der Einfluss von SFRS10 auf das Spleißen des Tau-Exons 10 gezeigt.

Tau ist ein Protein des Cytoskeletts, das hauptsächlich in Neuronen exprimiert wird und von Bedeutung bei der Polymerisierung und Stabilisierung von Mikrotubuli ist (Delacourte and Buee 1997). Es sind sechs Tau-Proteinisoformen beschrieben, die über alternative Spleißprozesse generiert werden (Andreadis et al. 1992). Das Tau-Exon 10 codiert eine Mikrotubuli-Bindestelle, so dass Tau-Proteine, je nach Spleißen der mRNA, drei oder vier dieser Bindestellen (Tau-3R bzw. -4R) beinhalten. Neurone weisen ein spezifisches Verhältnis von 3R- und 4R-Proteinen auf. Wird dieses Verhältnisses gestört, kann es zu neurodegenerativen Prozessen und zu der Ausbildung so genannter neurofibrillärer Bündel kommen (Andreadis 2005). Eine solche Struktur formiert sich auch mit Ablagerungen des Tau-Proteins in Nerven- und Gliazellen und ist z.B. bei Alzheimer- und FTDP-17-Patienten (***f**ronto**t**emporal **d**ementia and **p**arkinson linked to chromosome **17***) zu beobachten. Bei diesen Patienten findet sich eine erhöhte Rate von Tau-4R, von Proteinen also, die von Exon 10-enthaltenden Transkripten generiert wurden. SFRS10 konnte als einer der Spleißfaktoren identifiziert werden, die den Einschluss des Tau-Exons 10 fördern (Jiang et al. 2003; Kondo et al. 2004). Mit der CLK2-vermittelten Phosphorylierung von SFRS10 wird dieser Prozess unterbunden (Hartmann et al. 2001). In verschiedenen Gehirnarealen von Patienten mit einer sporadischen Alzheimer wurde eine erhöhte SFRS10-Expression nachgewiesen (Glatz et al. 2006).

Bei der Reoxygenierung nach Ischämien wurde ebenfalls eine erhöhte Expression von SFRS10 dokumentiert. In Astrocyten und in ischämischen Gehirnarealen der Ratte wurde ein erhöhtes Sfrs10-Level nachgewiesen (Matsuo et al. 1995). Ferner wurde eine subzelluläre Lokalisationsänderung von SFRS10 nach einer Ischämie gezeigt. Hierbei war eine Akkumulation des Proteins im Cytoplasma zu beobachten, die mit einer Hyperphosphorylierung von SFRS10 einherging. Parallel wurde eine Veränderung im Spleißmuster von ICH-1 (ICH-1-Protease = Caspase-2) zugunsten von ICH-1S nachgewiesen. Das Protein kommt in zwei Isoformen vor, wobei ICH-1L die Apoptose induziert, während ICH-1S die Apoptose inhibiert (Daoud et al. 2002). Auch an Läsionsstellen von VSMCs (***v**ascular **s**mooth **m**uscle **c**ells*) konnte eine vermehrte Expression von SFRS10 gezeigt werden (Tsukamoto et al. 2001). Der Spleißfaktor könnte somit eine bedeutende Funktion bei der Reoxygenierung nach Hypoxie und den damit verbundenen proliferativen Prozessen spielen.
Auch bei anderen alternativen Spleißprozessen wurden SFRS10-Aktivitäten dargelegt. So wurde z.B. in Brustkrebsgewebe eine erhöhte SFRS10-Expression und das damit verbundene alternative Spleißen von CD44 – einem Zell-Adhäsionsmolekül und Transmembran-Glykoprotein – nachgewiesem werden (Watermann et al. 2006). Einige Isoformen von CD44 werden mit der Entwicklung maligner Tumoren und der Metastasierung in Verbindung gebracht.
Bei Überexpression von SFRS10 wurden erhöhte Konzentrationen des normalen Transkripts des *CFTR* (***c**ystic **f**ibrosis **t**ransmembrane **c**onductance **r**egulator*) in einem epithelialen Zellmodell mit einer Spleiß-Mutation festgestellt. Letztlich erfolgte damit eine Aktivierung und Wiederherstellung des CFTR-Kanals (Nissim-Rafinia et al. 2004).
Neben den beschriebenen Funktionen wurde bei Überexpression von SFRS10 eine Revertierung des *SMN2*-Spleißmusters beobachtet (siehe 1.5.4) (Hofmann et al. 2000).
Der Spleißfaktor ist also an zahlreichen alternativen Spleißprozessen involviert. Viele der geschilderten Untersuchungen erfolgten *in vitro* oder *ex vivo* und an Minigenen nach einer Überexpression von SFRS10, so dass die native Beteiligung und Funktion von SFRS10 an alternativen Spleißprozessen nicht gänzlich belegt ist.

1.5 Die spinale Muskelatrophie

1.5.1 Charakteristika und Klassifizierung der SMA

Die spinale Muskelatrophie (SMA) ist eine autosomal rezessive Erbkrankheit, die nach der cystischen Fibrose die häufigste, von einem ererbten Gendefekt bedingte Todesursache im Kindesalter ist (Crawford and Pardo 1996; Roberts et al. 1970). Die Inzidenz in Europa liegt bei 1:6000, wobei die Heterozygotenfrequenz 1:35 beträgt (Cusin et al. 2003; Feldkotter et al. 2002). Die Krankheit führt zu der progressiven Degeneration von α-Motoneuronen im Vorderhorn des Rückenmarks. In einer sekundären Konsequenz kommt es bei den Patienten zu Muskelschwäche und Atrophie der gesamten proximalen Arm- und Beinmuskulatur, die sich im Verlauf der Erkrankung auf die gesamte Rumpfmuskulatur ausweitet. Die zeitlichen und phänotypischen Ausprägungen der SMA variieren stark, so dass zwischen vier SMA-Subtypen unterschieden wird (Munsat and Davies 1992; Zerres and Rudnik-Schoneborn 1995). Tabelle 1.2 gibt eine Übersicht der beschriebenen SMA-Klassifizierungen. In wenigen Familien sind haploidentische Geschwister von SMA-Patienten beschrieben, die nicht erkranken („Diskordante“) (Cobben et al. 1995; Hahnen et al. 1995; Wang et al. 1996).

Tabelle 1.2: Übersicht der SMA-Klassifizierungen

SMA-Typ	Manifestationsalter	Motorische Entwicklung	Lebenserwartung
Typ I (Werdnig-Hoffmann)	≤ 6 Monate	kein selbstständiges Sitzen oder Gehen	meist < 2 Jahre; Tod wegen Atemmuskulaturlähmung
Typ II (intermediäre SMA)	> 6 Monate	selbstständiges Sitzen, kein selbstständiges Stehen oder Gehen	> 2 Jahre; 70% der Patienten werden älter als 20 Jahre
Typ III (Kugelberg-Welander)	18 Monate bis 30 Jahre; Typ IIIa: < 3 Jahre Typ IIIb: > 3 Jahre	selbstständiges Sitzen und Gehen; dennoch häufig Rollstuhl-gebunden	kaum eingeschränkt
Typ IV (adulte SMA):	> 30 Jahre	normal; oftmals nur geringfügig eingeschränkte motorische Funktion (Wirth 2002)	normal

1.5.2 Molekulargenetik der SMA

Die SMA wird in etwa 94% der bekannten Fälle wegen einer homozygoten Deletion/Genkonversion des *survival* ***m****otor* ***n****euron*-Gens (*SMN1*) ausgelöst. Das Gen ist auf dem langen Arm des Chromosoms 5 (5q13) innerhalb einer duplizierten und invertierten Region von etwa 500 kb lokalisiert und beinhaltet neun Exons (1, 2a, 2b-8), die ein Transkript von ~1,5 kb codieren (Chen et al. 1998; Lefebvre et al. 1995). Neben der telomerischen *SMN1*-Kopie liegt eine centromerische zweite Kopie des Gens – *SMN2* – vor. Diese unterscheidet sich von *SMN1*

nur über fünf Nucleotide, wobei drei von diesen in intronischen Sequenzen des Gens und eines im 3'-nicht-translatierten Bereich liegen. Eine C- zu T-Transition in Exon 7 (Position +6) des Gens führt zwar nicht zu einem Aminosäureaustausch im Proteinprodukt, bewirkt jedoch letztlich die Generierung von aberranten Transkripten, bei denen Exon 7 deletiert ist (*SMNΔ7*) (Burglen et al. 1996; Lefebvre et al. 1995; Lorson et al. 1999; Monani et al. 1999). Bedingt wird dies wegen der Zerstörung einer Bindestelle (***s**plicing **e**nhancer*; SE1) für den Spleißfaktor SF2/ASF in Exon 7 (Cartegni and Krainer 2002). Der Spleißfaktor hnRNP-A1 übt zudem über die Bindung eines ***e**xonic **s**plicing **s**ilencers* (ESS) einen inhibitorischen Effekt auf den Einschluss des *SMN2*-Exons 7 aus und fördert so die Generierung des aberranten *SMNΔ7* (Kashima and Manley 2003). Vom *SMN1*-Gen werden fast ausschließlich Volllängetranskripte (VL) generiert, während von *SMN2* vorwiegend Transkripte generiert werden, denen Exon 7 fehlt (Gennarelli et al. 1995; Lefebvre et al. 1995; Parsons et al. 1996). Das aberrante Proteinprodukt (SMNΔ7) kann die Funktion des Volllängeproteins nicht gewährleisten (Lorson and Androphy 2000). Da vom *SMN2*-Gen nur 10-20% Volllängetranskripte generiert werden, SMA-Patienten jedoch keine *SMN1*-Kopie tragen, wird die phänotypische Ausprägung der SMA mit der *SMN2*-Kopienzahl bestimmt (Feldkotter et al. 2002; Lefebvre et al. 1995; McAndrew et al. 1997; Wirth 2000).

1.5.3 Das SMN-Protein

Das SMN-Protein (38 kDa; 294 As) wird ubiquitär, wenn auch besonders stark in Rückenmark und Gehirn exprimiert (Coovert et al. 1997; Lefebvre et al. 1997). Das Protein ist sowohl im Cytoplasma als auch im Nucleus lokalisiert, in welchem es in punktförmigen Strukturen, den so genannten *gems* (***gem**inini of coiled bodies*), vorkommt. Diese sind in der Nähe der *cajal bodies* lokalisiert – nucleäre Domänen, die mit U-snRNPs (1.1) angereichert sind (Liu and Dreyfuss 1996; Young et al. 2000). Der Carboxyterminus des von *SMN2* generierten trunkierten Proteinprodukt (SMNΔ7; 282 As) ist deletiert. Daher oligomerisiert SMNΔ7 nur ineffizient, ist ferner instabil und wird somit schnell degradiert (Lefebvre et al. 1997; Lorson and Androphy 2000; Lorson et al. 1998). Die wohl bestbeschriebene Funktion des SMN-Proteins liegt in der Zusammenlagerung von RNA-Proteinkomplexen wie den snRNPs (Eggert et al. 2006; Meister et al. 2002; Meister and Fischer 2002; Pellizzoni et al. 2002; Terns and Terns 2001). SMN findet sich mit den Proteinen Gemin 2-8 und *unrip* in einem Multi-Protein-Komplex (~1 MDa). Dieser Hauptkomplex interagiert mit anderen Proteinen wie z.B. den Sm-Proteinen, die die Basis der U-snRNPs bilden (vgl. 1.1). Der SMN-Komplex hat eine bedeutende Funktion bei der Zusammenlagerung der Sm-Kernstruktur der U-snRNPs und deren Transfer auf die U-snRNA

(Fischer et al. 1997; Meister et al. 2001; Meister and Fischer 2002; Neuenkirchen et al. 2008; Pellizzoni et al. 2002). SMN scheint auch nach dem Spleißen an der Regeneration der U-snRNPs beteiligt zu sein, so dass die snRNPs erneut in aktiver Form vorliegen (Meister et al. 2000; Mourelatos et al. 2001; Pellizzoni et al. 1998). SMN hat somit eine konstitutive Funktion bei der Zusammenlagerung und Dissoziation der snRNPs und damit beim Spleißen.

Trotz der beschriebenen Funktion von SMN beim Spleißen ist nicht abschließend geklärt, weshalb ein Mangel des Proteins bei SMA-Patienten in erster Linie zu der Degeneration von α-Motoneuronen führt. Versuche an Zebrafischen sprechen für eine „snRNP-unabhängige" Funktion von SMN in Motoneuronen (Carrel et al. 2006). Das Protein ist in Neuronen sowohl in Axonen als auch in den so genannten Wachstumskegeln (*growth cones)* – einer dynamischen Aktin-haltigen Struktur wachsender Neurone – lokalisiert (Fan and Simard 2002; Rossoll et al. 2002; Sharma et al. 2005; Zhang et al. 2006; Zhang et al. 2003). Eine Interaktion des Aktin-bindenden Proteins hnRNP-R mit SMN lässt vermuten, dass das Protein eine Funktion im axonalen RNA-Transport zu den *growth cones* einnimmt (Mourelatos et al. 2001; Rossoll et al. 2002). So zeigte sich auch in kultivierten Motoneuronen und in sensorischen Neuronen von *Smn*$^{-/-}$*; SMN2*$^{+/+}$-Mäusen (siehe auch 1.5.5) eine starke Minderung der Länge von Axonen, der Größe der *growth cone*s und eine Reduktion an β-Aktin (Jablonka et al. 2006; Rossoll et al. 2003). Ferner konnte für das Aktin-bindende Protein Profilin eine Assoziation und Co-Lokalisation mit SMN in Neuronen gezeigt werden (Sharma et al. 2005). SMN wird, im Gegensatz zu seinem trunkierten Gegenstück SMNΔ7, entlang der Axone transportiert. Eine Überexpression von SMNΔ7 führt ferner zu verkürzten Axonen (Zhang et al. 2006). Vieles spricht somit für eine Funktion von SMN in der Prozessierung und dem Transport von mRNA entlang der Axone. Hinweise auf eine Motoneuronen-spezifische Funktion von SMN gehen auch aus der Identifikation von Plastin 3 als modifizierendes Protein bei SMA-diskordanten Familien hervor (Oprea et al. 2008). Plastin 3 bindet monomere globuläre G-Aktin-Filamente und fördert deren Bündelung zu filamentösem F-Aktin. Letzteres akkumuliert an den *growth cones* (Delanote et al. 2005). Es konnte ein protektiver Effekt von Plastin 3 in Bezug auf die Länge von kultivierten Motoneuronen von *Smn*$^{-/;}$*, SMN*$^{+/+}$-Mäusen gezeigt werden. Zudem wurde an Zebrafisch ein *rescue*-Effekt des *Smn*-Phänotyps nachgewiesen (Oprea et al. 2008).

1.5.4 Die Beteiligung von SFRS10 am Spleißen des *SMN*

Der alternative Spleißweg von *SMN2* wird mit *trans*-aktivierenden Spleißfaktoren reguliert. Hierbei sind drei Bindestellen in *SMN*-Exon 7 (SE1-3; ***S****plicing* ***E****nhancer*) von besonderer Bedeutung (Lorson and Androphy 2000; Pellizzoni et al. 1999). Mittels *in vitro*-Co-

Transfektionen bei ansteigenden Mengen des Spleißfaktors SFRS10 mit einem *SMN2*-Minigen in HEK293-Zellen und in murinen Fibroblasten konnte eine Revertierung des *SMN2*-Spleißmusters zugunsten des korrekt gespleißten Volllängetranskripts (~20% *Δ7*/~80% *VL*) gezeigt werden. SFRS10 bindet spezifisch eine GA-reiche Region (SE2) in *SMN*-Exon 7. Bei Deletion dieser Domäne in *SMN1* wird auch von diesem Gen ausschließlich *SMNΔ7* generiert (Hofmann et al. 2000). Mit Hilfe weiterer *in vitro* Spleißexperimente wurde nachgewiesen, dass die Spleißfaktoren hnRNP-G, RBM und SRp30c mit SFRS10 interagieren, die Bindung von SFRS10 stabilisieren und somit die Revertierung der alternativ gespleißten *SMN2*-Transkripte in korrekt gespleißte Volllängetranskripte fördern (Hofmann and Wirth 2002; Young et al. 2002b). Hierbei bindet hnRNP-G effizient aber unspezifisch die *SMN*-RNA, bildet jedoch direkte Protein-Protein-Interaktionen mit SFRS10 aus (Hofmann and Wirth 2002). SRp30c und SFRS10 interagieren ebenfalls. Ersteres bindet jedoch die *SMN*-RNA nur schwach (Young et al. 2002b). Der Komplex wird über zusätzliche Interaktionen zwischen hnRNP-G und SRp30c weiter stabilisiert (Venables et al. 2000). Somit ist SFRS10 wohl neben SF2/ASF einer der bedeutendsten Spleißfaktoren zur Generierung von Volllängetranskripten vom *SMN*-Gen. Abbildung 1.5 zeigt ein Modell für das Spleißen des *SMN*-Exons 7 (Hofmann and Wirth 2002). Nach diesem bindet der Spleißfaktor SF2/ASF den SE1 des *SMN*-Exons 7 und führt zu seinem Einschluss in das generierte Transkript bei Integrität des SE2 (Lorson and Androphy 2000) (Abbildung 1.5A). Die Zerstörung des SE1 über die C- zu T-Transition in *SMN2*-Exon 7 verhindert die Bindung von SF2/ASF an die 3'-Spleißstelle des *SMN*-Transkripts und somit den Einschluss dieses Exons (Cartegni and Krainer 2002). Wegen des fehlenden Antagonsimus von SF2/ASF zu hnRNP-A1 (Gottlicher et al. 2001; Venables et al. 2000) übt dieser einen starken inhibitorischen Effekt auf den Einschluss von Exon 7 aus (Cartegni et al. 2006; Kashima and Manley 2003). Mit der Bindung von SFRS10 an den AG-reichen SE2 und die Bildung eines funktionellen Komplexes mit anderen Spleißfaktoren wird vom *SMN2*-Gen dennoch ~20% Volllängetranskript generiert (Abbildung 1.5B, oben), dessen Konzentration bei Überexpression der Spleißfaktoren SFRS10, hnRNP-G und/oder SRp30c auf ~80% ansteigen kann (Abbildung 1.5B, unten) (Hofmann and Wirth 2002; Young et al. 2002b).

Obwohl bei verringerten SMN-Konzentrationen auf Proteinebene auch reduzierte SFRS10-Konzentrationen festgestellt wurden, konnte eine direkte Interaktion der Proteine nicht gezeigt werden (Helmken et al. 2003). SFRS10 wurde zwar als sehr potenter Spleiß-Aktivator des *SMN2*-Volllängetranskripts identifiziert (Hofmann et al. 2000), konnte jedoch als modifizierender Faktor in SMA-diskordanten Familien ausgeschlossen werden (Helmken and Wirth 2000).

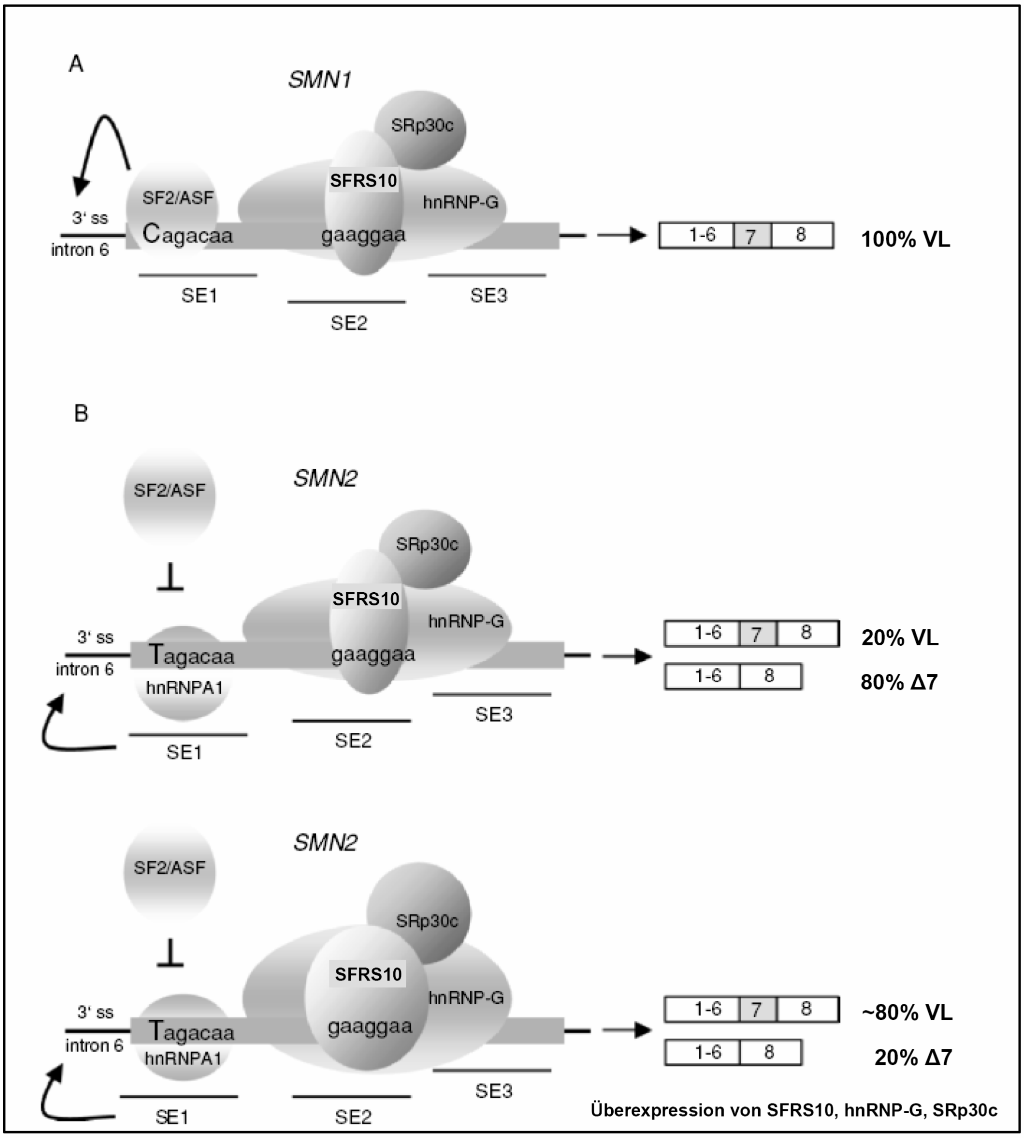


Abbildung 1.5: Modell des Spleiß-Komplexes für *SMN*-Exon 7; A. vom *SMN1*-Gen werden 100% Volllängetranskripte generiert, da SF2/ASF den SE1 in Exon 7 bindet und den Einschluss des Exons fördert. Auch SFRS10, hnRNP-G und SRp30c fördern diesen Prozess. **B**. Die C- zu T-Transition in Exon 7 des *SMN2* verhindert die Bindung von SF2/ASF, womit hnRNP-A1 einen starken inhibitorischen Effekt auf den Einschluss des Ex7 ausüben kann. Über Bindung von SFRS10 an SE2 und Interaktionen mit hnRNP-G und SRp30c werden ~20% VL- und ~80% Δ7-Transkripte von diesem Gen generiert (B-oben). Bei Überexpression der Spleißfaktoren wird das Spleißmuster von *SMN2* zugunsten des VL-Transkripts revertiert (B-unten) (Wirth et al. 2006a).

1.5.5 SMA-Mausmodelle

In den letzten Jahren sind zahlreiche Mausmodelle zur Analyse der Pathogenese der SMA generiert worden. Da Mäuse nur das dem humanen *SMN1* entsprechende Gen *Smn*, jedoch kein Äquivalent zu *SMN2* tragen (DiDonato et al. 1999; DiDonato et al. 1997; Viollet et al. 1997), führt der ubiquitäre *knock-out* des Gens zu früher embryonaler Letalität zwischen Tag E2.5 und

E3.5 (Schrank et al. 1997). Heterozygote *Smn*$^{+/-}$-Mäuse zeigen symptomatisch keine Atrophie der Muskeln, jedoch eine ~50%ige Reduktion an SMN-Protein und eine daraus resultierende Degeneration der α-Motoneuronen nach sechs Lebensmonaten (Jablonka et al. 2000). Über die Generierung transgener Mäuse, die neben dem *knock-out* für das murine *Smn* das humane *SMN2*-Transgen in unterschiedlicher Kopienanzahl tragen, konnte ein adäquates Tiermodell für die SMA generiert werden. In Abhängigkeit von der *SMN2*-Kopienzahl zeigen die Tiere hierbei unterschiedlich ausgeprägte SMA-Phänotypen, wobei zwei *SMN2*-Kopien den embryonal letalen *Smn*$^{-/-}$-Phänotyp auf P5 (vergleichbar mit einer SMA Typ I) und acht Kopien den *Smn-knock-out* komplett zu kompensieren vermögen (Hsieh-Li et al. 2000; Monani et al. 2000). Mit einem doppelt transgenen Mausmodell, in welchem eine SMA-*missense* Mutation in Exon 1 (A2G) auf dem genetischen Hintergrund *Smn*$^{-/-}$*; SMN2*$^{+/+}$ heterozygot exprimiert wurde, wurde eine deutliche Milderung des SMA-Phänotyps mit einer Verlängerung der Lebenserwartung auf ein Jahr gezeigt. Auf einem wildtypischen genetischen Hintergrund zeigen die Tiere keinen offensichtlichen Phänotyp, wenn sie diese Mutation homozygot tragen. Die Expression des mutierten Transgens allein vermag den letalen Phänotyp des *Smn*$^{-/-}$-Genotyps nicht auszugleichen. Dennoch scheint das trunkierte Protein die Stabilität der geringen SMN-Proteinmengen zu stabilisieren, die vom *SMN2*-Gen des entsprechenden Mausmodells generiert werden (Monani et al. 2003).

Mit der Expression des trunkierten *SMNΔ7* unter Kontrolle des *SMN*-Promotors in *Smn*$^{-/-}$*; SMN2*$^{+/+}$-Mäusen konnte die Lebensspanne von SMA-Mäusen von 5 auf 14 Tage verlängert werden. Das trunkierte SMNΔ7-Protein assoziiert mit dem SMN-Protein und stabilisiert den oligomeren SMN-Komplex. Hiermit wurde gezeigt, dass die Expression von SMNΔ7 keine negativen Auswirkungen auf die Tiere hatte (Le et al. 2005).

Neben den geschilderten ubiquitären Deletionen und Überexpressionen von *SMN* wurden auch konditionale (1.6.4) *Smn-knock-outs* generiert und untersucht. So zeigten Tiere mit einer neuronal-spezifischen Deletion des *Smn*-Exons 7 Tremor um P14, atrophische Muskelfasern, morphologische Veränderungen in Motoneuronen und eine durchschnittliche Lebenserwartung von 25 Tagen (Frugier et al. 2000). Tiere mit einer spezifischen Deletion des *Smn*-Exons 7 in der Skelettmuskulatur entwickelten um P21 eine zunehmend schwere Muskeldegeneration, die um P33 zum Tode führte (Cifuentes-Diaz et al. 2001). Ein Leber-spezifischer *knock-out* des *Smn*-Exons 7 führte auf Grund von Anomalien während der Leberentwicklung zu embryonaler Letalität um E17 (Vitte et al. 2004). Mit einer spezifischen SMN-Expressionen in Neuronen von *Smn*$^{-/-}$*; SMN2*$^{+/+}$-Mäusen konnte der SMA-Phänotyp stark abgemildert werden (Lebenserwartung von P5 auf P210; normale Anzahl an Motoneuronen), während mit einer Expression des

Proteins in der Skelettmuskulatur keine Verbesserung des SMA-Phänotyps festgestellt werden konnte (Gavrilina et al. 2008). Die geschilderten konditionalen *Smn-knock-out*-Modelle verdeutlichen die bedeutende Funktion des SMN in diesen Gewebe- bzw. Zelltypen.

1.5.6 Therapieansätze für die spinale Muskelatrophie

Eine Therapie für die spinale Muskelatrophie existiert zurzeit noch nicht. Die Transkriptionsaktivierung des *SMN2*-Gens bzw. die Revertierung des *SMN2*-Spleißmusters stellen jedoch vielversprechende Ansätze dar. In den letzten Jahren sind HDAC-Inhibitoren – Histondeacetylase-inhibierende Substanzen – in den näheren Fokus der Untersuchungen gelangt. Diese Substanzen inhibieren die HDACs und verhindern somit die Kondensation des Chromatins, was letztlich zu einer Transkriptionsaktivierung führt. Mit den Substanzen Natriumbutyrat (Chang et al. 2001), Valproat (Brichta et al. 2003; Brichta et al. 2006; Sumner et al. 2003), Phenylbutyrat (Andreassi et al. 2004), SAHA und M344 (Hahnen et al. 2006; Riessland et al. 2006) konnte eine Aktivierung der Transkription von *SMN2* und eine Revertierung des *SMN2*-Spleißmusters zugunsten des VL-*SMN* gezeigt werden. Bei Untersuchungen der Spleißfaktoren-Konzentrationen nach Behandlungen mit diesen Substanzen wurde interessanterweise eine Korrelation des Anstiegs der VL-*SMN2*-Transkripte mit dem der SFRS10-Konzentration festgestellt. So wurde bei der Verwendung von Valproat *in vitro* ein 2-5facher Anstieg des VL-*SMN2*-Transkripts gezeigt, der wegen eines 3-4fachen Anstiegs von *SFRS10* bedingt zu sein schien. Bei Behandlung von organotypischen *hippocampalen* Hirnschnittkulturen der Ratte hingegen war nur ein geringfügiger Anstieg von Sfrs10 zu beobachten (Brichta et al., 2003). Auch bei der Behandlung mit Natriumbutyrat und M344 lag die Revertierung des *SMN2*-Spleißens einer erhöhten *SFRS10*-Expression zugrunde (Brichta et al. 2003; Chang et al. 2001; Riessland et al. 2006).

1.6 Mausgenetik

Im Rahmen dieser Arbeit sollten Mausmodelle generiert werden, mit welchen das Wirkungsspektrum des Sfrs10 untersucht werden könnte. Auf Grund dessen seien im Folgenden grundlegende Stadien der Embryonalentwicklung und Techniken zur Modifikation des Mausgenoms erklärt.
Im Laufe der letzten Jahrzehnte bewies sich die Maus als einer der bedeutendsten Modellorganismen zur Erforschung von Entwicklungsprozessen, Verhalten, der Physiologie und Pathogenese der *Mammalia in vivo*. Die Vorteile liegen einerseits in einer relativ einfachen Zucht und Haltung, andererseits in der für einen Säuger verhältnismäßigen kurzen Generationszeit von drei Monaten. Zudem ist neben klassischen genetischen Analysen die Generierung und Untersuchung von genetischen Veränderungen möglich.

1.6.1 Embryonalentwicklung der Maus

Die Embryonalentwicklung der Maus umfasst 21 Tage. Von der Befruchtung der Eizelle bis zum adulten geschlechtsreifen Tier liegt eine Zeitspanne von ~12 Wochen. Man bezeichnet die Embryonalstadien je nach Entwicklungstag mit E0-21 oder auch mit dpc (*days post coitum*). Beginnend mit der Geburt an „Tag 0“ werden alle postnatalen Stadien mit P bezeichnet. Im Folgenden sollen die embryonalen Entwicklungsstadien und die beginnende Organogese bis zum Tag ~9 zusammenfassend geschildert werden (siehe auch Abbildung 1.6). Hierbei können je nach Mausstamm Entwicklungsschwankungen von 0,25-0,5 Tagen bestehen.
Die Befruchtung der Eizelle findet im Ovidukt statt, erst dann kommt es zum Abschluss der Meiose. Die Zygote ist – wie schon die Eizelle – von einer schützenden Hülle umgeben – der Zona pellucida. Die Furchung findet ebenfalls im Ovidukt statt und umschreibt die erste Phase der Embryonalentwicklung nach der Befruchtung. Während dieses Stadiums teilt sich die Zygote in Blastomeren ohne an Größe zuzunehmen. Aus diesen Teilungen geht an ~E2.5 die Morula (8-16-Zellstadium) hervor. Mit weiteren Teilungen bildet sich bis E3.5 die Blastocyste, die bereits aus zwei Zellgruppen besteht – der inneren Zellmasse und dem sie umgebenden Trophoektoderm. Das Trophoektoderm bildet im weiteren Entwicklungsverlauf extraembryonale Strukturen, die der Versorgung des Embryos dienen, während der eigentliche Embryo aus einem Teil der inneren Zellmasse (*inner cell mass*; ICM) hervorgeht. Das Trophoektoderm pumpt Flüssigkeit ins Blastocysteninnere, so dass sich schließlich ein flüssigkeitsgefüllter Vesikel (Blastocoel) bildet, das seitlich angelagert die ICM enthält. Dreieinhalb bis viereinhalb Tage nach der Befruchtung teilt sich die ICM. Die Schicht, die hierbei in Kontakt mit dem

Blastocoel steht, entwickelt sich zum primitiven Endoderm und dient der Ausbildung extraembryonaler Strukturen. Der andere Teil der ICM bildet sowohl den eigentlichen Embryo als auch extraembryonale Membranen und wird auch als primitives Ektoderm oder als Epiblast bezeichnet. Während dieser frühen Teilungen wandert der Embryo vom Ovidukt in den Uterus. Um ~E4.5 löst sich der Embryo von der Zona pellucida, der sich über Eindringen von „Riesenzellen" des muralen Trophoektoderms – sie enstehen über Endoreplikation – in die Uteruswand einnistet (Nidation/Implantation). Der restliche polare Teil des Trophoektoderms wächst zum ektoplacentalen Kegel und zum extraembryonalen Ektoderm – beide Strukturen tragen zur Placentabildung bei. Einige Zellen des primitiven Endoderms wandern aus und bedecken schließlich als extraembryonales Endoderm die innere Trophoektodermwand. Die verbleibenden Zellen des primitiven Endoderms – das viscerale Endoderm – hüllen den Eizylinder ein. Dieser enthält den Epiblasten und zieht sich schließlich in die Länge. An E6 hat sich im Epiblasten die so genannte proamniotische Höhle gebildet. Der Embryo selbst besteht aus einer gekrümmten Epithelschicht in Form eines Bechers.

An E6.5 beginnt mit der Gastrulation die Anlage der Keimblätter (Tabelle 1.3). Die Embryonen werden als knötchenförmige Verdickungen im Uterus sichtbar. Zwischen Embryo und Endometrium liegt als weitere Schicht die sogenannte Decidua. Die Achsenbildung des Embryos beginnt mit der Bildung des Primitivstreifens als lokale äußere Verdickung am posterioren Ende. Proliferiende Epiblastenzellen durchwandern den Primitivstreifen, breiten sich zu den Seiten nach vorn aus und bilden schließlich eine mesodermale Schicht. Die viscerale Endodermschicht wird schrittweise von in sie einwandernde Epiblastenzellen ersetzt. Am posterioren Ende des Primitivstreifens bildet sich extraembryonales Mesoderm, welches schließlich zur Bildung des Amnions (Fruchtblase), des Dottersacks, der Allantois und des Chorions beiträgt. Diese vier extraembryonalen Hüllen umgeben schließlich den Embryo. Das Chorion geht aus dem Trophoblasten und mesodermalem Anteilen hervor und umhüllt den Embryo sowie alle anderen extraembryonalen Hüllen. Das Amnion geht aus dem ektoplacentalen Kegel oberhalb des Epiblasten hervor und umschließt nun den Embryo in der mit Fruchtwasser gefüllten Amnionhöhle. Der Dottersack befindet sich unterhalb des Embryos und ist der primäre Bildungsort von Blutzellen. Die Allantois entwickelt sich als Ausstülpung der embryonalen Darmanlage und wird später über Fusion mit dem Chorion in die Nabelschnur integriert, wo sie Blutgefäße bildet. Der Primitivstreifen verlängert sich zum Vorderende und bildet den Primitiv-Knoten. Aus den Zellen, die durch den Knoten nach vorn wandern, bildet sich die Chorda dorsalis – das Notochord oder die Urwirbelsäule. An demselben Ende bilden sich die Somiten. Das viscerale Endoderm wird von Zellen, die das Mesoderm durchwandern, ersetzt. Sie bilden eine endoder-

male Schicht, die sich später zum Darm differenziert. An ~E8.5 haben sich auf der dorsalen Seite die Neuralfalten gebildet. Der Embryo durchläuft nun einige Faltungen, in deren Verlauf das Endoderm nach ventral innen wandert, Herz und Leber ihre Positionen einnehmen und der Embryo sich schließlich dreht. Die Allantois wächst aus dem extraembryonalen Coelom immer weiter aus und legt sich von innen an das Chorion, wo sie an ~E8-9 mit diesem verschmilzt und die extraembryonalen Anteile der Placenta bildet. An ~E9 ist die Gastrulation abgeschlossen und die späte Organogenese setzt ein [aus Manipulating the Mouse Embryo; (Behringer 2003); Entwicklungsbiologie; (Wolpert 1998); Biologie;(Campbell 1997) The Atlas of Mouse Development; The Anatomical Basis of Mouse Development (Kaufman and Bard 1999; Kaufmann 1992)].

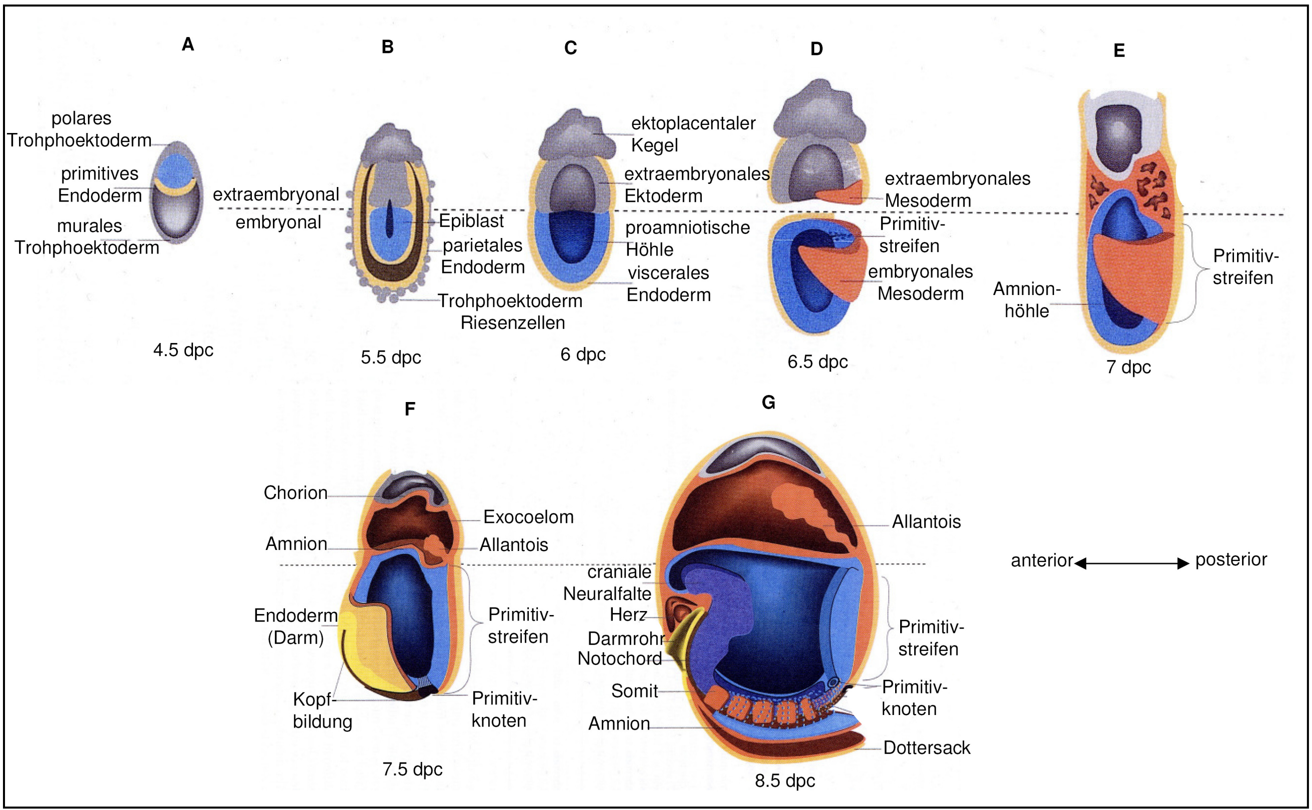
Tabelle 1.4 und Abbildung 1.6 geben eine Übersicht der frühen Entwicklung des Mausembryos bis Tag 9.5

Tabelle 1.3: Übersicht der Keimblätter und der aus ihnen hervorgehenden Strukturen

Ektoderm	Mesoderm	Endoderm
Epidermis der Haut, Nervensystem	Chorda dorsalis, Dermis der Haut, Somiten (Skelett, Muskeln, Nieren, Herz, Blut)	Darm, Leber, Lungen, Pankreas, Schilddrüse

Tabelle 1.4: Übersicht der wichtigsten Stufen der Entwicklung der Maus von E0.5-E9.5

Alter/dpc	Entwicklung
prä-Implantations-Periode	
0.5	Ein-Zell-Stadium; Embryo im Ovidukt
1.5	Zwei-Zell-Stadium; Embryo wandert Ovidukt herab
2.5	Morula, 8-16 Zell-Stadium; Ausbildung des Trophoektoderms; Embryo wandert zum uterotubalen Übergangsbereich
3.5	Blastocyste mit ICM und äußerer Trophoektodermschicht
4	freie Blastocysten ohne Zona pellucida
post-Implantations-Periode	
4.5	Einnisten der Blastocysten im Uterus; primitives Endoderm
5	Eizylinder
6	Differenzierung des Eizylinders; proamniotische Höhle; Bildung der extraembryonalen Reichert'schen Membran; Ektoplacenta mit maternalem Blut
6.5	Gastrulation; embryonale Achsenformation; extraembryonales und embryonales Ekto- und Endoderm
7	Frühes Primitivstreifenstadium; Mesodermbildung; Amnion
7.5	Spätes Primitivstreifenstadium; Allantois; Vorderdarm; Neuralplatte; Neuralfurche (Kopffurchen); erste Blutinseln im mesodermalen Anteil des Dottersacks;
8	Neuralfaltenstadium; 1-7 Somiten, beginnende Fusion von Allantois und Chorion erster Aortenbogen
8.5	8-12 Somiten; Drehung des Embryos; beginnende Herzentwicklung; Vaskularisierung; Pronephron
9	13-20 Somiten, beginnender Herzschlag
9.5	21-29 Somiten; beginnende Lungenentwicklung



<u>Abbildung 1.6:</u> Schematische Darstellung der Entwicklung des Mausembryos vom Implantations- bis zum Neurulationsstadium; A. Implantation an 4.5 dpc; der Embryo besteht aus drei verschiedenen Gewebelinien (Trophoektoderm = grau, primitives Endoderm = beige, Epiblast = blau). **B.** Differenzierung des primitiven in das parietale Endoderms; Nidation über Einwachsen von Riesenzellen des Trophoblastoektoderms in die Unteruswand; **C.** Differenzierung des parietalen in das viscerale Enoderm; der Epiblast umgibt als Epithelium die proamniotische Höhle; Bildung des ektoplacentalen Kegels. **D.** Ausbildung des Primitivstreifens; das Mesoderm tritt in Form zweier Streifen unter dem Epiblasten hervor und dehnt sich in die extraembryonale Region aus; **E**. Ausdehnung des Primitivstreifens; **F**. Bildung der Dottersackhöhle (Exocoelom); Chorion- und Amnionbildung; Ausdehnung des Primitivstreifens mit Bildung des Primitivknotens; beginnende Kopf- und Notochordbildung (braun) aus dem Knoten; Ausbildung der Allantois am posterioren Teil des Primitivstreifens; **G.** Organisation des Neuroektoderms (lila) in Neuralfalten; das Mesoderm differenziert sich zum Herzen und in Somiten; das Endoderm bildet das Darmrohr (gelb) [modifiziert nach Manipulating the Mouse Embryo (Behringer 2003)]

1.6.2 Genetische Modifikationen der Maus

Das Genom der Maus umfasst in der haploiden Form ~2,5 x 10^9 bp [*Draft*-Sequenz (Waterston et al. 2002)] und ~25.000 proteincodierende Gene, wovon sich 99% Orthologe im humanen Genom finden lassen. Umgekehrt gibt es zum humanen Genom 80% murine Orthologe, wobei die durchschnittliche Übereinstimmung der Proteinsequenzen bei 78,5% liegt (Boguski 2002). Die nahe Verwandtschaft zum Menschen, die dabei jedoch relativ einfache Handhabung und Zucht der Tiere und Manipulierbarkeit des Genoms ermöglichen die *in vivo*-Funktionsanalysen bestimmter Gene. So können z.B. mit der Pronucleus-Injektion (Stadium direkt nach der Befruchtung, vor Verschmelzen der Vorkerne 0.5 dpc) (Gordon et al. 1980; Palmiter et al. 1982) oder über die Transfektion von embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) (Robertson et al. 1986) transgene Tiere generiert werden, die ein artfremdes Gen exprimieren oder endogene Gene überexprimieren. Neben groß angelegten Mutagenese-*screens* zur Identifikation potenziell krankheitsauslösender Gendefekte (Kiernan et al. 2002; Shiroishi 2001; Srivastava et al. 2003), lassen sich mit dem *gene targeting* gezielt murine Gene modifizieren. Hierbei können Gene mit einem sogenannten *knock-out* entweder konstitutiv oder induzierbar deaktiviert werden. Die Maus ist das bisher einzige Modellsystem für *Mammalia*, bei dem eine zielgerichtete Mutagenese mit dem *gene targeting* möglich ist.

1.6.3 *Gene targeting*

Mit dem *gene targeting* können über homologe Rekombination sequenz-spezifische Modifikationen ins Mausgenom eingebracht werden, so dass Gene gezielt ausgeschaltet oder verändert werden (Gossler et al. 1986; Robertson et al. 1986; Taylor et al. 1998). Für diese Modifikationen werden murine embryonale Stammzellen verwendet, die mittels molekularbiologischer Methoden *in vitro* genetisch manipuliert werden (Gossler et al. 1986; Robertson et al. 1986). Wegen ihrer Pluripotenz können sich ES-Zellen theoretisch zu allen Zelltypen entwickeln und daher auch zu der Entwicklung eines kompletten Organismus beitragen. So können sie nach einer genetischer Modifikation auch zur Generierung chimärer Mäuse verwendet werden (siehe auch 2.9.5) (Bradley et al. 1984; Gossler et al. 1986; Robertson et al. 1986). Tragen die Chimären modifizierte Keimbahnzellen, so kann diese genomische Modifikation vererbt werden. In den folgenden Generationen können dann die phänotypischen Auswirkungen analysiert werden (Schwartzberg et al. 1989; Zijlstra et al. 1989).

Entscheidend für die genetische Modifikation von ES-Zellen ist die homologe Rekombination eines *targeting*-Konstruktes, welches über Elektroporation in die Zellen gebracht wird (Taylor et al. 1998). Das Konstrukt beinhaltet möglichst lange homologe Sequenzabschnitte zu der ge-

nomischen Region, in welche es inseriert werden soll, da sich für gewöhnlich nur eine äußerst geringe Frequenz der homologen Rekombination ($1{:}10^6$ bis $1{:}10^9$) im Vergleich mit einer zufälligen Insertion zeigt. Zudem garantieren Selektionsmarker, die Bestandteil des *targeting*-Konstruktes sind, eine Identifizierung homolog-rekombinanter Klone (Mansour et al. 1988).

1.6.4 Sequenz-spezifische Rekombinationssysteme

Die Anwendung des klassischen *gene targeting* ist limitiert, da der ubiquitäre *knock-out* eines Gens zu früher embryonaler Letalität führen kann und somit postnatale phänotypische Untersuchungen nicht mehr möglich sind. Ferner können kompensatorische Effekte redundanter Gene den Phänotyp kaschieren. Das konditionale *gene targeting* ermöglicht ein zeit- oder gewebsspezifischen Gen-*knock-out* mit der Verwendung sequenz-spezifischer Rekombinationssysteme (Marth 1996; Rajewsky et al. 1996). Hierbei werden DNA-Rekombinasen niederer Organismen verwendet, die Sequenz-spezifisch eine Deletion induzieren können.

1.6.4.1 Das Cre/loxP-System

Das dem Bakteriophagen *P1* entstammende Cre/loxP-Rekombinationssystem basiert auf einem Sequenz-spezifischen Rekombinationsmechanismus, der normalerweise für die Integration des Phagengenoms in und die Exzision aus dem „Gast“-Chromosom benötigt wird. Die Cre-Rekombinase (*causes* ***re****combination)* gehört zur Familie der λ-Integrasen und hat eine Größe von 35 kDa. Das Enzym vermag die Rekombination zwischen zwei spezifischen Sequenzen ohne Benötigung von Co-Faktoren oder anderen assoziierten Proteinen auch in Säugetierzellen zu induzieren (Abremski and Hoess 1984; Abremski et al. 1983; Sternberg 1981; Sternberg and Hamilton 1981; Sternberg et al. 1981a; Sternberg et al. 1981b). Die Rekombinase vermittelt die Rekombination zwischen zwei sogenannten loxP-Stellen (***lo****cus of crossover* ***(x)*** *in* ***P1***) – eine je 34 bp lange Sequenz, welche aus zwei jeweils 13 bp langen invertierten Sequenzen (*inverted repeats*) besteht, die von einem 8 bp langen *spacer* separiert werden. Mit der Expression eines *Cre*-Transgens unter der Kontrolle eines zeit- oder gewebespezifischen Promotors wurden die ersten konditionalen *gene targetings* ermöglicht (Gu et al. 1993; Hamilton and Abremski 1984; Sauer and Henderson 1988; Taylor et al. 1998; Utomo et al. 1999). Die Cre-induzierte Rekombination zwischen zwei loxP-Stellen gleicher Orientierung auf einem Allel führt zur Exzision eines dazwischen befindlichen DNA-Fragments, so dass schließlich nur eine intakte loxP-Stelle verbleibt (Kilby et al. 1993). Obwohl loxP-Stellen endogen nicht im *Mammalia*-Genom vorkommen, kann nach einer entsprechenden Modifikation des Genoms (Gu et al. 1993) mit sol-

chen Stellen eine Cre-vermittelte Rekombination induziert werden (Sauer and Henderson 1989, 1990). Diese genetische Modifikation wird in ES-Zellen über homologe Rekombination eines *targeting*-Konstruktes erzielt, bei welchem das zu deletierende Gen oder Gen-Segment von loxP-Stellen umrandet ist und so zunächst in den Zellen und auch später in den Tieren normal exprimiert wird. Erst mit dem Einkreuzen bestimmter Mauslinien, die das *Cre*-Transgen ubiquitär, zeit- oder gewebesspezifisch exprimieren, wird die Deletion des Gens induziert (Lakso et al. 1992; Orban et al. 1992; Rajewsky et al. 1996).

1.6.4.2 Das Flp/FRT-System (Sadowski 1995)

Die Flp-Rekombinase aus *Saccharomyces cerevisiae* (Cox 1983; Huang et al. 1991; Rodriguez et al. 2000; Sadowski 1995) ist ein 48 kDa großes Protein, das ein Tetramer zweier FRT-Stellen (***F****lp* ***r****ecombinase* ***t****arget*) kovalent bindet und die Spaltung und Ligation dieser Stellen katalysiert (Cox 1983). Eine minimal funktionelle FRT-Stelle umfasst 34 bp mit einem 8 bp *spacer*, der von zwei invertierten direkt zueinander orientierten repetitiven Sequenzen von je 13 bp flankiert wird (Futcher 1988).

Das Flp/FRT-Rekombinationssystem ist auf Grund der Thermolabilität des Enzyms bei physiologischen Temperaturen wenig effizient in *Mammalia* (Rodriguez et al. 2000). Inzwischen wurden Flp-Proteine mit einer verbesserten Rekombinationseffizienz bei 37°C generiert (Schaft et al. 2001). Die Flp-vermittelte Deletion eines FRT-flankierten DNA-Segments kann *in vivo* genutzt werden. So genannte Flp-*deleter*-Mäuse (Farley et al. 2000; Rodriguez et al. 2000) exprimieren das *Flp*-Transgen unter Kontrolle des ubiquitär exprimierten *ROSA26*-Promotors.

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Die geschilderten Erkenntnisse über SFRS10 im Kontext alternativer Spleißprozesse (1.4.3) zeigten zahlreiche Involvierungen des Proteins, ließen jedoch Fragen zu dessen generellen Wirkungsspektrum in *Mammalia* unbeantwortet. Die beschriebenen alternativen Spleißwege wurden zudem weitgehend an Minigenen und mittels Überexpression des Spleißfaktors oder an pathophysiologisch-verändertem Material (z.B. Tumorgewebe) untersucht. Diese Bedingungen deuten eine native Situation an, können diese jedoch nicht vollständig reflektieren. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war die Gewinnung neuer Erkenntnisse über Sfrs10 in *Mammalia*. Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag somit in der Planung, Generierung, Etablierung und Analyse eines adäquaten murinen *in vivo*-Modells zur Klärung dieser Fragestellungen. Die Methoden zur Generierung, zur Handhabung und Charakterisierung solcher Mausmodelle wurden im Rahmen dieser Arbeit in unseren Laboratorien etabliert.

Einerseits sollte die spezifische Funktion von SFRS10 im Kontext des alternativen Spleißens von *SMN2 in vivo* beleuchtet werden (1.5.4). Hierfür sollte zunächst in einer transgenen Maus-Linie (Yvonne Hofmann, Doktorarbeit) die neuronal-spezifische Expression des humanen *SFRS10*-Transgens sichergestellt und verifiziert werden. Das Ziel dieser Versuche war letztlich die Generierung einer *SFRS10*-transgenen SMA-Maus, um die SFRS10-vermittelte Modulation des *SMN2*-Spleißmusters und die dadurch bedingte Modifikation des SMA-Phänotyps *in vivo* analysieren zu können.

Neben diesen *SMN*-spezifischen sollten weitere Aspekte der Sfrs10-Funktionen *in vivo* analysiert werden. Eine SMA-Therapie basierend auf einer Heraufregulation von SFRS10 könnte auch unvorhersehbare Konsequenzen auf die Regulation anderer Transkripte haben. Die Ziele dieser Analysen lagen somit in der Erfassung des Wirkungsspektrums des Spleißfaktors. Da die Erkenntnisse der SFRS10-abhängigen Generierung von VL-*SMN* bisher nur an humanen Zellen untersucht wurden, sollte zudem *in vivo* die Bedeutung des Sfrs10 in Bezug auf das *Smn*-Spleißen näher beleuchtet werden. Zu diesen Zwecken wurde ein *knock-out* des *Sfrs10*-Gens in der Maus strategisch ausgearbeitet und durchgeführt. Da die phänotypischen Konsequenzen eines ubiquitären *Sfrs10-knock-outs* nicht abzusehen waren, sollte die *Sfrs10*-Deletion auch Gewebe-spezifisch möglich oder induzierbar sein. Aus diesem Grund sollte der *Sfrs10-knock-out* nicht direkt, sondern über die Cre-loxP-vermittelte Rekombination erfolgen. Hierfür wurde eine adäquate *Sfrs10-targeting*-Strategie entwickelt und umgesetzt. Letzteres umfasste die Klonierung eines *targeting*-Konstruktes, die Transfektion von murinen ES-Zellen und die Etablierung und Durchführung von Methoden zur Selektion und Verifizierung homolog-

rekombinanter ES-Zell-Klone. Über die Generierung chimärer Tiere sollten verschiedene *Sfrs10*-Linien generiert und –soweit möglich – charakterisiert werden. Hierbei sollte der Cre-vermittelte *knock-out* des Gens mit dem Einkreuzen adäquater transgener Maus-Linien induziert werden. Zunächst sollte auf diesem Weg ein ubiquitärer *Sfrs10-knock-out* generiert und analysiert werden. Je nach den phänotypischen Konsequenzen dieser Deletion sollten weitere konditionale *Sfrs10-knock-outs* generiert werden. Zu diesem Zweck sollte auch für zukünftige Projekte eine stabile *Sfrs10*$^{FL/FL}$-Linie mit dem homozygot gefloxten *Sfrs10* generiert werden.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Soweit nicht anders vermerkt, wurden jegliche Chemikalien mit der Qualitätsbezeichnung *pro analysis* verwendet. Alle Standardchemikalien, organische Substanzen und Lösungsmittel wurden von folgenden Firmen bezogen: Amersham, Freiburg; Applichem, Darmstadt; BioRad, München; Bode Chemie, Telgte; Fermentas, St. Leon-Rot; Gibco/BRL, Paisley (Schottland); Invitrogen, Carlsbad (USA); Merck, Darmstadt; MWG, Ebersberg; PerkinElmer, Massachusetts (USA); Peqlab, Erlangen; Promega, Mannheim; Riedel de Haen AG, Seelze; Roche Molecular Biochemicals, Mannheim; Sigma Chemie, Taufkirchen; Serva, Heidelberg; Stratagene, La Jolla (USA); Roth, Karlsruhe; VWR, Darmstadt .

2.2 Materialien und Substanzen

2.2.1 Materialien zur Analyse und Klonierung von Nucleinsäuren

Material	Hersteller
α^{32}P dCTP: Desoxycytosin-5'-[α^{32}P]-triphosphat	Amersham
BigDye®TerminatorV1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems
dNTPs	Peqlab
Endo Free® Plasmid Maxi Kit	QIAGEN
Fast Start DNA Master SYBR Green I Kit	Roche
Gel *Blotting* Papier	Schleicher&Schuell
Kapillaren für den LightCycler® 20 µl	Roche
Mikrotiterplatte (96-well) FIA-plate, black	Greiner
Nylon Membran: Hybond XL	Amersham
Oligo-dT-Primer 0,5 mg/ml	Operon
Phase Lock Gel™ Heavy: 2 ml	Eppendorf
Phase Lock Gel™ Heavy: 15 ml	Eppendorf
Plasmid Miniprep Kit, Quantum Prep®	BioRad
Probe Quant™ G-50 Micro Columns	Amersham
QuantiTect® Reverse Transcription Kit	QIAGEN
QIAquick® PCR Purification Kit	QIAGEN
QIAEX® Gel Extraction Kit	QIAGEN
QIAshredder	QIAGEN
QIAzol	QIAGEN
Rediprime™II RandomPrimeLabelingSystem	Amersham
Repli-g®whole genome amplification Kit Mini	QIAGEN
RiboGreen® RNA Quantification Kit	Molecular Probes

RNase-Free DNase set	QIAGEN
RNase Inhibitor 40 U/µl	Invitrogen
RNeasy® Mini	QIAGEN
Röntgenfilme: Kodak BioMax XAR Film, 24 x 30 cm	Kodak
Röntgenfilmkassetten: X-Ray Kassette	Kisker Biotech
S.N.A.P.™ UV-free Purification Kit	Invitrogen

2.2.2 Materialien für *Western*-Analysen

Material	Hersteller
Acrylamid/Bisacrylamid 29:1 (30%)	Biorad
APS, Ammoniumpersulfat	Applichem
BSA, Bovine Serum Albumin	Sigma-Aldrich
Chemilumineszenz-Kit, Super Signal West Pico Chemilumineszenz Substrate	Pierce
Filterpapier (*Blotting*-Papier)	Whatman
Filme, Hyperfilm ECL	Amersham
Film-Kassette	Agfa
Magermilchpulver	Applichem
Nitruzellulosemembran	Schleicher & Schuell
Restore *Western Blot* Stripping Buffer	Pierce

2.2.3 Materialien für die Immunhistologie

Material	Hersteller
GIEMSA, Färbelösung	Roth
DPX, Einbettmedium	Roth
Kresylviolett-Acetat; Nissl-Färbung	Sigma
Magermilchpulver	Applichem
Mounting-Medium, Einbettmedium	Vector Labs
Vectastain ABC-Kit PK-6100	Vector Labs

2.2.4 Materialien für die Zellkultur

Material	Hersteller
Bacillol®	Bode
D-MEM: *Dulbecco's modified eagle medium* (+D-Glucose, +L-Glutamin, -Sodiumpyruvat, -Sodiumphosphat)	Gibco/BRL
D-MEM: optimiert für ES-Zellen (+D-Glucose, +Sodiumpyruvat, -L-Glutamin)	Gibco/BRL
D-PBS: *Dulbeccos phosphate buffered saline* (1x) (-$CaCl_2$, -$MgCl_2$)	PAA
fetales Kälberserum (FKS)	PAN Biotech
Ganciclovir (Ganc)	Hoffmann-La Roche
Gelatine 2%ig	Sigma-Aldrich

L-Glutamin 200 mM	Invitrogen
Geniticin (G418-Sulfat)	Gibco/BRL
leukemia inhibitory factor 1000x (LIF)	Embl
β-Mercaptoethanol 1000x (ME)	Merck
Mitomycin C (MMC)	Sigma
nicht-essentielle Aminosäuren 100x (NEAs)	Invitrogen
PBS (*phosphate buffered saline*) -Ca^{2+}, -Mg^{2+}	Biochrom
PBS (*phosphate buffered saline*) +Ca^{2+}, +Mg^{2+}	Biochrom
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)	Invitrogen
Sterillium®	Bode
Sodiumpyruvat 100 mM (1000x)	Invitrogen
Transfektionspuffer RPMI (w/o Phenolrot)	Gibco/BRL
Trypsin-EDTA-Lösung (1x)	Invitrogen

2.2.5 Materialien für die Arbeit mit Mäusen

Material	Hersteller
Applikator für Ohrmarken (1005-s1)	Nation Band and Tag Co
Knieschere (BC 8641R)	Aesculap
Mikropinzette (FM002R)	Aesculap
Ohrmarken aus Metall, nummeriert (1005-1)	Nation Band and Tag Co
Pinzette, anatomisch (BD047R)	Aesculap
Skalpell, chirurgisch, Einmalgebrauch (5518040)	Aesculap
Splitterpinzette, spitz (BD302)	Aesculap
Splitterpinzette, gekrümmt (BD312)	Aesculap
Schere, fein (BC 100R)	Aesculap
Schere, stumpf (BC 341R)	Aesculap
Schere (BC 321R)	Aesculap

2.3 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien wie Plastikware wurden von folgenden Firmen bezogen: Becton-Dickinson, Schwechat; Brand, Wertheim; Corning Incorporated GmbH, Kaiserslautern; Dispomed, Gelnhausen; Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen; Eppendorf, Hamburg; Lab/Cor, Seattle (USA); Millipore, Eschborn; Nalgene, Hereford (UK); Nunc, Wiesbaden; Pechiney Plastic Packaging, Chicago (USA); Roth, Mannheim; Sarstedt, Nürnbrecht; Schleicher und Schuell, Dassel; Starlab, Ahrensburg; Vitaris, Baar.

2.4 Geräte

2.4.1 Allgemeine Geräte

Geräte	Hersteller
Bunsenbrenner	Campingaz, Gasprofi
Chemidoc XRS	BioRad
Einfrierröhrchen: CryoPlus-Gefäße 1,8 ml	Sarstedt
Elektrophoresekammer: MGV-602T, SGE-020-02, E-H6	C.B.S.&Scientific, Febikon
Entwicklermaschine: Curix 60	Agfa
Feinwaage: ARJ 120-4M	Sartorius
Heizblock	Techne, HLC
Kreisschüttler: GFL 3015	GFL
Kühlschrank	Liebherr, AEG
Magnetrührer	Jankel&Kunke, Heidolph
Mikrowelle	Bosch
Mikroskop, Axioplan 2	Zeiss
NanoDrop: ND-1000 Spektrophotometer	Peqlab
Netzgerät: PowerPac HC™ Power Supply	BioRad
pH-Meter: Labor-pH-Meter inoLab pH Level 1	WTW
Photometer	Eppendorf
Pipetten: 0,5-10 µl, 2-20 µl, 10-100 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl, 500-5000 µl	Eppendorf
Pipettierhilfe: Pipetboy acu	IBS
Reagenzglasschüttler: Vortexer	Heidolph
Reinstwasseranlage	Millipore
Rotator	Kister
Stereomikroskop, Stemi DRC	Zeiss
Tiefkühlschrank	Liebherr, Bosch
Thermoschüttler	HLC
Ultra-Turrax, Gewebehomogenisator	IKA
Waage	Kern und Sohn GmbH
Wasserbad	GFL, Fischerbrand

2.4.2 Geräte zur Analyse und Klonierung von Nucleinsäuren

Geräte	Hersteller
Elektroporator: Micro Pulser™	BioRad
Elektroporationsküvette (*E. coli* Pulser® Cuvette 0,1 cm)	BioRad
Geigerzähler LB 1210B	Berthold
Hybridisierungsofen: 65 °C, Drehinkubator	Bachofer
Hybridisierungsröhren	Bachofer
Inkubationsofen: 65 °C, für Waschpuffer	Fastnacht
Inkubationsofen: 80 °C, für Membranen	Fastnacht
Kontaminationsmonitor: LB124	Berthold
LightCycler 1.5	Roche

Schüttelinkubator für Bakterien: Innova 44 series shakers	Brunswick
Schweißgerät: Vacumaster	Ismet
SpeedVac Concentrator FBC 620	Eppendorf
TECAN Safire^2, Mikrotiterplatten Lesegerät,	Tecan
Thermozykler: Peltier Thermal Cycler	BioRad
Thermozykler: GeneAmp® PCR-System 9700	Applied Biosystems
Vakuum-Geltrockner	GFL
Zentrifuge: Avanti J-20 XPI	Beckmann Coulter

2.4.3 Geräte für *Western*-Analysen

Geräte	Hersteller
Elektrophoresekammer, Mini Trans-Blot Cell	BioRad
Elektro-Transformator, Power Pac 3000 Power Supply	BioRad
Schwenkinkubator	GFL
Schüttelinkubator	GFL
Transfer-Kammer für *Western Blots*, Mini Trans-Blot Cell	BioRad

2.4.4 Geräte für die Immunhistologie

Geräte	Hersteller
Färbekammer	Roth
Glaskasten und Färbegestell	Roth

2.4.5 Geräte für die Zellkultur

Geräte	Hersteller
Elektroporator: Gene Pulser Xcell	BioRad
Elektroporationsküvette (Gene Pulser Küvetten, 0,4 cm)	BioRad
Handdispenser: Mulitpipette plus, manuell	Eppendorf
Inkubator: Heraeus BBD 6220	Heraeus
Mikroskope: Leica DM IL, Leica L2	Leica
Multiabsauger: 8-Kanal	Drummond
Multipipette: 12-Kanal-Pipette, 50 - 300 µl	Finnpipette
Multipipette: 8-Kanal, Eppendorf 4780	Eppendorf
Sterilbank Heraeus HA 2448	Heraeus
Vakuumpumpe	VWR
Zählkammer	Neubauer

2.5 Lösungen und Puffer

2.5.1 Lösungen und Puffer für die Analyse und Klonierung von Nucleinsäuren

Lösung/Puffer	Zusammensetzung
Antibiotika-Stocklösungen	Ampicillin (30 mg/ml Ampicillin-Natriumsalz) gelöst in 50% (v/v) EtOH und 50% (v/v) ddH_2O; Kanamycin (25 mg/ml Kanamycin-Sulfat), gelöst in 100% (v/v) ddH_2O; Chloramphenicol (30 mg/ml Chlor-amphenicol), gelöst in 50% (v/v) EtOH und 50% (v/v) ddH_2O
Blaumarker (Probenpuffer) (10x)	100 mM EDTA (pH 8); 1% (w/v) SDS; 50% (v/v) Glycerin; 0,1% (w/v) Bromphenolblau
Count Off-Lösung	2% (v/v) Count Off in H_2O
EDTA-Lösung	0,5 M EDTA pH 8,0; autoklaviert
Einfriermedium für Bakterien (5x)	0,5 M NaCl; 0,05 M $MgSO_4$; 0,25 M Tris-HCl pH 7,5; 0,05% (w/v) Gelatine; 50% (v/v) Glycerin; autoklaviert
Elektrophoreselaufpuffer	10x TBE auf 1x verdünnt mit H_2O
Luria-Bertani-(LB-)Agar	0,015% (w/v) Agar in LB-Medium
Luria-Bertani-(LB-)Flüssigmedium	20% (w/v) Trypton; 10% (w/v) Hefeextrakt; 10% (w/v) NaCl; autoklaviert; Lagerung 4°C
Lysispuffer für Gewebe und Zellen	100 mM Tris/HCl pH 8,5; 5 mM EDTA; 0,2% (w/v) SDS; 200 mM NaCl; 200 µg/ml Proteinase K (jeweils frisch zugesetzt)
Natriumcarbonatlösung für Silberfärbungen	3,75% Na_2CO_3, vor Gebrauch mit 0,5 µl Formaldehyd pro ml Lösung
NaH_2PO_4-Puffer	1 M NaH_2PO_4 pH 7,0; autoklaviert
PAA-Gelstocklösung (10%, nativ) (49:1)	49 g Acrylamid; 1 g Bisacrylamid; 25 ml 10x TBE; 500 µl TEMED; ad. ddH_2O 500 ml; Lagerung 4°C; vor Gebrauch 200 µl 10% APS pro 20 ml *stock*-lösung hinzufügen
Prähybridisierungsmix/Hybridisierungsmix für *Southern Blots*	0,5 M NaH_2PO_4 pH 7; 0,7% (w/v) SDS; 1 mM EDTA pH 8,0; 0,5 mg/ml Salm-Spemien-DNA
10x PCR-Puffer	500 mM KCl; 100 mM Tris pH 8,3; 15 mM $MgCl_2$; 0,1% Gelatine; in H_2O; steril filtriert
RT-Mix	für 1 ml: 400 µl 5x RT-Puffer; 200 µl DTT (100 mM); 25 µl jedes dNTPs (à 100 mM); 100 µl DEPC-H_2O
Salm-Spermien-DNA-Lösung	1% Salm-Spermien-DNA (sonifiziert) in TE-Puffer pH 8,0; ü.N. bei 37 °C lösen; Lagerung bei 4°C
Silbernitratlösung	0,2% $AgNO_3$-Lösung; vor Gebrauch mit 1 µl 37% Formaledehyd pro ml Lösung
Strip-Lösung für *Southern Blots*	40 mM NaH_2PO_4 pH 7,0; 0,1% (w/v) SDS; 1 mM EDTA pH 8,0

20x SSC-Lösung	150 mM NaCl; 15 mM Na-Citrat; pH 7,0
TE-Puffer	10 mM Tris/HCl pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0; autoklaviert
TE^{-4}-Puffer	10 mM Tris/HCl pH 8,0; 0,1 mM EDTA pH 8,0; für DNA aus Geweben mit RNaseA (Endkonzentration 50 µg/ml) versetzt
Tris/HCl-Puffer	1 M Tris pH 8,0; autoklaviert

2.5.2 Lösungen und Puffer für *Western*-Analysen

<table>
<tr><th>Lösung/Puffer</th><th colspan="4">Zusammensetzung</th></tr>
<tr><td><u>Acrylamidgel:</u>
1. Sammelgel</td><td>Substanz</td><td>1 Gel
(2 ml)</td><td>2 Gele
(3 ml)</td><td>4 Gele
(5 ml)</td></tr>
<tr><td></td><td>H_2O</td><td>1,4 ml</td><td>2,1 ml</td><td>3,4 ml</td></tr>
<tr><td></td><td>30% Aa-Lsg. 29:1</td><td>330 µl</td><td>500 µl</td><td>830 µl</td></tr>
<tr><td></td><td>1M Tris pH 6,8</td><td>250 µl</td><td>380 µl</td><td>630 µl</td></tr>
<tr><td></td><td>10% SDS</td><td>20 µl</td><td>30 µl</td><td>50 µl</td></tr>
<tr><td></td><td>10% APS</td><td>20 µl</td><td>30 µl</td><td>50 µl</td></tr>
<tr><td></td><td>TEMED</td><td>2 µl</td><td>3 µl</td><td>5 µl</td></tr>
<tr><td>2. Trenngel 10%/12%</td><td>Substanz</td><td>1 Gel
(5 ml)</td><td>2 Gele
(10 ml)</td><td>4 Gele
(20 ml)</td></tr>
<tr><td></td><td>H_2O</td><td>2/1,7ml</td><td>4/3,3 ml</td><td>7,9/6,6 ml</td></tr>
<tr><td></td><td>30% Aa-Lsg. 29:1</td><td>1,7/2ml</td><td>3,3/4 ml</td><td>6,7/8 ml</td></tr>
<tr><td></td><td>1,5 M Tris pH 8,8</td><td>1,3 ml</td><td>2,5 ml</td><td>5 ml</td></tr>
<tr><td></td><td>10% SDS</td><td>50 µl</td><td>100 µl</td><td>200 µl</td></tr>
<tr><td></td><td>10% APS</td><td>50 µl</td><td>100 µl</td><td>200 µl</td></tr>
<tr><td></td><td>TEMED</td><td>2 µl</td><td>4 µl</td><td>6 µl</td></tr>
<tr><td>Blocklösung für Western Blots</td><td colspan="4">6% Magermilchpulver in TBS-Tween</td></tr>
<tr><td>Bradford-Lösung</td><td colspan="4">100 mg Coomassie Brilliant Blue; 100 ml Orthophosphorsäure 85%; 50 ml EtOH 95%; ad 1 l ddH_2O; filtrieren; Lagerung bei 4°C</td></tr>
<tr><td>Hybridisierungslösung für Western Blots</td><td colspan="4">2% Magermilchpulver in TBS-Tween</td></tr>
<tr><td>Laemmli-Puffer 2x</td><td colspan="4">62,5mM Tris-Base (0,757 g); 10% Glycerin (20 ml); 0,01% Bromphenolblau (10 mg); 3% SDS (6 g); ad 90 ml ddH_2O; vor Gebrauch mit 1/10 Vol. β-Mercaptoethanol zu versetzen</td></tr>
<tr><td>Elektrophoresepuffer (10x)</td><td colspan="4">0,25 M Tris (30,29 g); 1,92 M Glycin (144,13 g); 1% SDS (10 g); ad 1 l H_2O; pH 8,3</td></tr>
<tr><td>RIPA-Puffer</td><td colspan="4">150 mM NaCl; 1% Igepal; 0,5% DOC; 0,1% SDS; 50 mM Tris; pH 8 (bei Geweben ad 1 Tablette Proteaseinhibitoren pro 50 ml)</td></tr>
<tr><td>TBS-Tween</td><td colspan="4">20 mM Tris (12,1 g); 137 mM NaCl (40 g); 0,5% Tween 20 (25 ml); ad 5 l dH_2O; pH 7,56</td></tr>
<tr><td>Transferpuffer</td><td colspan="4">15 mM Tris-Base (12,1 g); 150 mM Glycin (56,3 g); 20% Methanol (1000 ml); ad 5l dH_2O</td></tr>
</table>

2.5.3 Lösungen und Puffer für die Immunhistologie

Lösung/Puffer	Zusammensetzung
Blocklösung für Schnitte	20% FKS; 1% BSA in TBS; Lagerung in 2 ml Aliquots bei -20°C
Farblösung für die Peroxidase	1 Tablette DAB (10 mg; 0,2 mg/ml); 0,025 g Imidazol (7,4 mM); 0,3 g Nickelammonium-sulfat (15,2 mM); 2,25 µl H_2O_2 (0,002%) in 50 ml TBS
Fixierlösung für LacZ-Färbungen	0,4 ml 25% Glutaralaldehyd (0,1 %); 2 ml 37% Formaldehyd (1,5 %); 2,5 ml EGTA 100mM pH 7,3 (5 mM); 0,1 ml 1 M $MgCl_2$ (2 mM); 45 ml 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 7,3; Endvolumen= 50 ml (ist jedes Mal frisch zuzubereiten)
GIEMSA-Färbelösung	Stammlösung 1:20 in ddH_2O
Kresylviolett-Acetatlösung	0,5%ig in ddH_20; über Nacht lösen lassen; steril filtrieren; ein Jahr haltbar
Paraformaldehyd zur Gewebsfixierung	4 % PFA in 0,1 M PBS; pH 7,3
0,1 M Phosphatpuffer pH 7,3 für LacZ-Färbungen	0,1M Natriumphosphat-monobasic; 0,1M Natriumphosphat-dibasic
10x TBS	0,1 M Tris; 1,5 M NaCl; mit ddH_2O. auf 1x verdünnen
X-Gal-Färbelösung	2 ml 25mg/ml X-Gal *stock*-Lösung (gelöst in Dimethylformamid); 0,106 g Eisen-Ferrocyanid (5 mM); 0,082 g Eisen-Ferricyanid (5 mM); 48 ml Waschpuffer (Endvolumen = 50 ml) X-Gal-*stock*-Lösung: Aufbewahrung im Dunkeln/-20°C; X-Gal-Färbelösung: Aufbewahrung im Dunkeln/4°C (die Lösung kann nach Filtration wieder verwendet werden)
Citratpuffer	0,01 M Zitronensäure-Lösung; pH 6,0

2.5.4 Reagenzien und Medien für die Zellkultur

Medium/Reagenz	Zusammensetzung
Embryonales Fibroblasten-(EF)Medium	500 ml D-MEM +Glutamax; 60 ml EF-FKS; 6 ml 100x Sodiumpyruvat
Embryonales Stamm-Zell-(ES)Medium	500 ml D-MEM; 75 ml ES-FKS; 6 ml 100x Sodiumpyruvat; 6 ml 100x L-Glutamin; 6 ml 100x nicht-essentielle Aminosäuren, 0,6 ml *leukemia inhibitory factor* (LIF); 0,6 ml 0,1 M β-Mercaptoethanol
Blastocysten-Medium (M2-Medium)	250 ml D-MEM; 45 ml EF-FKS, 3 ml Sodiumpyruvat; 3 ml NEAs; 3 ml Pen/Strep; 3 ml L-Glutamin, 8,35 ml HEPES
Einfriermedium	70% Medium der einzufrierenden Zellen; 20% FKS; 10% DMSO

Einfriermedium für ES-Zell-Platten	20% DMSO in ES-FKS
Injektionsmedium (M16 Medium)	250 ml Blastocysten-Medium; 0,0375 g DNaseA; Aufbewahrung in 5 ml Aliquots bei -20°C
1x Trypsin/EDTA	10 ml 10x Trypsin/EDTA; 90 ml PBS
Trypan-Blau	4%ige *stock*-Lösung: 0,4 g Trypanblau in 10 ml ddH_2O; Gebrauchslösung: 5 ml *stock*-Lösung in 45 ml PBS
Mitomycin C (MMC)	2 mg MMC gelöst in 2 ml EF-Medium; steril filtriert; 1:100 Verdünnung in 200 ml EF-Medium (Endkonzentration: 10 µg/ml)
0,1% Gelatine (w/v)	1:20 Verdünnung von 2%iger Gelatine-Stammlösung in PBS
Geneticin (G418-Sulfat)	600x Stammlösung: 5 g G418-Sulfat in 28 ml PBS; 1 ml/600 ml ES-Medium (Endkonzentration: 300 µg/ml-225 µg/ml aktive Konzentration)
Ganciclovir (Ganc)	Stammlösung: 4,3 mg Ganc in 80 µl ddH_2O; 10 µl 1:100 in ES-Medium; steril filtriert; 1:1000 in ES-Medium (Endkonzentration 2 µM)

2.6 Sonstige Materialien

2.6.1 Größenstandards

2.6.1.1 Standards zur Analyse von Nucleinsäuren

Standard/Hersteller	**Fragmente**														
100 bp-Marker, Applichem	bp	1ooo	900	800	700	600	500	400	300	200	100				
100 bp-Marker, Invitrogen	bp	1200	1100	1000	900	800	700	600	500	400	300	200	100		
1 kb-Marker, Applichem	kb	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1				
1 kb-Marker, Invitrogen	kb	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1,5	0,75	0,5

2.6.1.2 Proteinstandards

Standard/Hersteller	**Fragmente**									
Page Ruler Plus, Fermentas	kd	250	130	95	72	55	36	28	17	11
Protein Ladder, NE-Biolabs	kd	250	150	100	75	50	37	25	20	15	10

2.6.2 Enzyme und Enzyminhibitoren

Alle Enzyme und Enzyminhibitoren wurden mit den von den entsprechenden Firmen empfohlenen Puffern verwendet.

2.6.2.1 Restriktionsenzyme

Enzym/Konzentration		Hersteller
BamH I	10 U/µl	NE-Biolabs
Bgl II	10 U/µl	Fermentas
Bsm I	10 U/µl	Fermentas
Hinc II	20 U/µl	Fermentas
Hind III	10 U/µl	NE-Biolabs
Nco I	50 U/µl	NE-Biolabs
Nsi I	20 U/µl	NE-Biolabs
Not I	10 U/µl	NE-Biolabs
Pst I	20 U/µl	NE-Biolabs
Sal I	10 U/µl	NE-Biolabs
Xho I	20 U/µl	NE-Biolabs

2.6.2.2 Sonstige Enzyme

Enzym/Konzentration	Hersteller
Alkalische Phosphatase (aus Shrimps)	Fermentas
HIFI-Taq-Polymerase, 5 U/µl	Roche
Superscript II Reverse Transcriptase, 50 U/µl	Invitrogen
T4-Ligase	Fermentas
Taq-Polymerase, 5 U/µl	Invitrogen

2.6.2.3 Enzyme zum Abbau von DNA, RNA und Proteinen und Enzyminhibitoren

Enzym/Konzentration	Hersteller
DNase I	QIAGEN
RNase A: 10 mg/ml *stock*-lösung, Endkonzentration 200 µg/ml; vor Gebrauch 10 min/95°C zur Deaktivierung von DNasen	Sigma-Aldrich
Proteinase K: 10 mg/ml, Endkonzentration 200 µg/ml	Applichem
Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets: 1 Tablette auf 50 ml RIPA-Puffer	Roche

2.6.3 Antikörper und Farbstoffe

Antikörper/Konzentration/Inkubationszeit	Hersteller
α-β-Aktin (Maus, monoklonal); 1:20000; 1 h	Sigma
α-SFRS10 (Kaninchen, polyklonal); 1:2000/2 h-ü.N. (*Western Blots*); 1:8000/ü.N. (Immunhistologie)	Eurogentec (Hofmann and Wirth 2002)
α-SMN (Maus, monoklonal); 1:10000/2 h	BD-Bioscience
α-ChAT (Ziege, polyklonal); 1:200; 1 h	Chemicon
α-Maus IgG (Ziege); Peroxidasekonjugat; 1:10.0000, 1 h	Dianova
α-Kaninchen IgG (Ziege); Peroxidasekonjugat 1:20.000; 1 h	Pierce
α-Kaninchen IgG (Ziege) biotinyliert; 1:400; ½ h	Dianova
α-Ziege IgG (Pferd) biotinyliert; 1:450; ½ h	Vector Labs
α-Kaninchen IgG (Pferd) AlexaFluor®546; 1:400; ½ h	Mobitec
Streptavidin konjugiertes AlexaFluor®488; 1:200; ½ h	Mobitec
Hoechst 33342 Dye; 1:1000; 3 min	Sigma

2.6.4 Plasmide, GVOs und Zellen

2.6.4.1 Verwendete Plasmide

Name	Marker/Genotyp	Hersteller
pCR®2.1-TOPO	LacZα, MCS, T7-Promotor, f1-*origin*, Ampicillin-Resistenz, Kanamycin-Resistenz, pUC-*origin*	Invitrogen
pCR®-XL-TOPO	Lac-Promotor, Lac Z-ORF, MCS, TOPO®Cloning Site, T7-Promotor, ccdB *lethal gene* ORF, Kanamycin-Resistenz, Zeocin-Resistenz, pUC-*origin*	Invitrogen
pRapidflirt	Neomycin-Resistenz, Ampicillin-Resistenz, Thymidinkinase, *Neo*-Promotor	Anja Brühl, Ari Waisman; (unveröffentlicht)
Maus-Pac, MPMGc121D18638Q2	murines *Sfrs10-Gen*, Matrize: DNA aus der Milz des Mausstammes 129/Sv	RZPD, Berlin

Vektorkarten und -sequenzen sind im Anhang unter 8.2 und unter 8.3 zu finden.

2.6.4.2 Verwendete/generierte GVOs

Vektor	Element/Beschreibung	GVO#/Lagerung -80°C
pRapidflirt (pRF)	nativer Vektor	GVO#300; Box Ylva I
Maus-Pac, MPMGc121D18638Q2	murines *Sfrs10-Gen*	GVO#163; Box Ylva I
TOPO XL	5'-Box in pRF- 3'-Box;	GVO#276, 277; Klone 3, 8; Box Ylva I
pRF	5'-Box	GVO#C2*; BoxYlva I
TOPO 2.1	KO-Region	GVO#275; Klon 7; Box Ylva I
pRF	KO in pRF-5'-/-3'-Box; komplettiertes *targeting*-Konstrukt (pRF-*Sfrs10*)	GVO#282; Klone B1.4, B1.7, B2.3; Box Ylva I
TOPO XL	3'-Box	GVO#278; Klon 6; BoxYlva I
pRF	3'-Box in pRF-KO;	GVO#280; Klon 8.2*; BoxYlva I
*Bemerkung zu GVOs #C2, #280: enthalten KO-Region in falscher Orientierung; diese wurde bei GVO#282 entfernt und in richtiger Orientierung einkloniert		

2.6.4.3 Generierte ES-Zell-Klone

Zellen/Klone	Element/Beschreibung	Lagerung (Stickstoff)
Bruce4; Klone A9, E6	homolge Rekombination des pRF-*Sfrs10;* bestätigt mit allen drei Sonden in *Southern*-Analysen; Injektion von A9; keine Keimbahntransmission	Box Ylva
V6.5; Klone G6, B8, G10, H6	homolge Rekombination des pRF-*Sfrs10;*G6 und B8 bestätigt mit allen drei Sonden, G10 und H6 mit der 5'-Sonde in *Southern*-Analysen; Injektion von G6; Keimbahntransmission	Box Ylva

2.6.4.4 Verwendete Zellen

Name	Ursprung/Hersteller	Verwendung
TOP10	Invitrogen	Zwischenklonierungen der Fragmente für pRF-*Sfrs10*
Elektro Max ™ DH5α-E™	Invitrogen	Transformation mit pRF-*Sfrs10*/Zwischenklonierungen
Bruce4-ES-Zellen	ICM einer C57BL/6-Thy1.1 Blastocyste (Kontgen et al. 1993); mit freundlicher Unterstützung von Dr. Thorsten Buch zur Verfügung gestellt	Transfektion des pRF-*Sfrs10*

V6.5-ES-Zellen	ICM einer ♂129/Sv x ♀C57BL/6 Blastocyste (Eggan et al. 2002); mit freundlicher Unterstützung der AG Prof. Dr. Brüning zur Verfügung gestellt	Transfektion des pRF-*Sfrs10*
MEF	murine embryonale Fibroblasten; Neo-resistent (Muller et al. 1991)	Wachstumsschicht für ES-Zellen
Sfrs10$^{FL/FL}$-MEF	im Rahmen dieser Dissertation generiert	*in vitro Sfrs10*-Deletion mit HTN-Cre Behandlung

2.6.5 Mauslinien

Linie	Quelle	Beschreibung
C57BL/6	Charles River (USA) oder Jackson Laboratories (USA)	Inzucht-Stamm, H-2^{b} Allotyp, schwarze Fellfarbe
CB20	Erhaltungszucht des Institutes für Genetik der Universität Köln	F1 von C57BL/6 x BALB/c, 20x auf BALB/c zurückgekreuzt
Flp-*deleter* (Rodriguez et al. 2000)	Erhaltungszucht des Institutes für Genetik der Universität Köln	*FLPe*-Transgen unter Kontrolle hACTB-regulatorischer Sequenzen
Cre-*deleter* (Schwenk et al. 1995)	Erhaltungszucht des Institutes für Genetik der Universität zu Köln	Ubiquitäre Expression des *Cre*-Transgens unter Kontrolle des hCMV Minimalpromotors; X-gekoppelt
Hb9-Cre (Arber et al. 1999).	mit freundlicher Unterstützung von der AG Prof. Dr. Silvia Arber, Basel, zur Verfügung gestellt; über Embryotransfer importiert	Motoneuronen-spezifische Expression des *Cre*-Transgens unter Kontrolle des nativen *Hb9*-Promotors
ROSA26-Cre reporter (Soriano 1999)	mit freundlicher Unterstützung von der AG Prof. Dr. Pasparakis, Köln, zur Verfügung gestellt	Induktion der LacZ-Expressionmit der Cre-Expression; Detektion des Cre-Expressionsprofils

2.6.6 Software und Datenbanken

2.6.6.1 Software

Software	Beschreibung	Hersteller
BioEdit	DNA-Analyse	Tom Hall
Chromas LITE Version 2.0	Sequenzanalyse	Technelysium Pty Ltd
1D-Scan	Quantifizierung von Proteinen	Scanalytics Inc.
Editseq/PrimerSelect/SeqBuilder	DNA/Protein-Analyse, Primersuche	DNASTAR Inc.
LightCycler Software Version 3.5	Auswertung von *Realtime*-PCRs	Roche

„Mausoleum“	Verwaltungsprogramm der Mausdaten	Hanns-Eugen Stöffler
Quantity One 4.5.1	Geldokumentation, Einscannen von Autoradiographien	BioRad
Vektor NTI®	Planung von Plasmiden, Gegenüberstellung von Sequenzen, Erstellen von Oligonucleotidsequenzen	Invitrogen
Microsoft Office XP Word Microsoft Office XP Excel Microsoft Office XP Powerpoint	Schreibprogramm Tabellenkalkulation Bearbeitung von Grafiken	Microsoft
XnView	Öffnen von JPEG und PNG Dateien	XnView
Endnote 9	Literaturverwaltung	Thomson

2.6.6.2 Datenbanken

Datenbank	Beschreibung
NCBI („National Center for Biotechnology Information“), http://www.ncbi.nlm.nih.gov/	Literaturrecherche
Ensembl Genome Browser, http://www.ensembl.org/index.html	Genomdatenbank
MGI („Mouse genome informatics“), http://www.informatics.jax.org/	Mausdatenbank
HUSAR Bioinformatics lab, http://genome.dkfz-heidelberg.de/	Analyse von Nucleotid- und Proteinsequenzen, Primersuche, Erstellen von Restriktionskarten

2.6.7 Verwendete Primer (Oligonucleotidstartermoleküle)

2.6.7.1 Primer für die Klonierung des pRF-*Sfrs10*

Bezeichnung		Nr.	Sequenz 5’→3’	°C
KO_fw	fw	2339	GTC GAC GTG ACC ACT TTA TAC AGA GGT AAA C	61°C
KO_rev	rev	2340	GTC GAC GAG AGG GCA CGA GAG GAC AAT C	61°C
Box1Bam_fw	fw	2406	GGA TCC GTT GAC ACT TTA GCC TAT TGT C	61°C
Box1Bam_rev	rev	2407	GGA TCC CCA TGG CAC AAC ACA TTG AGA GAG GAG	61°C
Box2_fw	fw	2341	CTC GAG CCA TGG CCA TGT AAA ATT ACT GGA ACC TTTTG	61°C
Box2_rev	rev	2342	CTC GAG CAT TCT AAG AGA GCT TAG CTT TTG C	61°C

2.6.7.2 Primer für die Sequenzierung

Bezeichnung		Nr.	Sequenz 5’→3’	°C
M13	fw	428	CTG GCC GTC GTT TT	56°C
M13	rev	819	CAG GAA ACA GCT ATG AC	56°C
Xho_fw	fw	2160	CGA AGT TAT AAG CTT GCG GCC	50°C
Box1new_rev	rev	2373	ATC GAT CCA TGG CAC AAC ACA TTG AGA GAG GAG	50°C
PPFBox2_fw	fw	2376	CTC ACA GGG TTA ACT AGG TTG	50°C

Box2Ex5seq_fw	fw	2402	GTA AGA TAC AGT GGT GCT TGA TC	50°C
Box2Ex6seq_fw	fw	2403	GTG GTA AAT TTG TAG TAC ACA	50°C
Xho_fw	fw	2160	CGA AGT TAT AAG CTT GCG GCC	50°C
KOseqBox2_fw	fw	2394	GAC AGT GGA GTT TTA GTA ACT TG	50°C
neo1/box1_fw	fw	2507	GTA GTG AAG GTC TGT TAC CC	50°C
neo1new_fw	fw	2528	GCT ATA CGA AGT TAT GAA TTG	50°C
neo2_fw	fw	2508	CTC GCG TCG TGC AGG ACG	50°C
neo3_fw	fw	2509	GAT TTG ATA TTC ACC TGG CCC	50°C
neo4new_fw	fw	2529	GCT CGA CGT TGT CAC TGA AG	50°C
neo5_fw	fw	2511	CTG GAT TCA TCG ACT GTG GCC	50°C
TK1_fw	fw	2516	GTC AAC AGC GTG CCG CAG ATC	50°C
TK2_fw	fw	2517	GTG AGA TAT CGG CCG GGG AC	50°C
TK3_fw	fw	2518	CTG GGG ACA GCT TTC GGG GAC	50°C
TK4_rev	rev	2519	CAC CCG TGC GTT TTA TTC TGT C	50°C

2.6.7.3 Primer für die Generierung von Sonden für *Southern*-Analysen

Bezeichnung		Nr.	Sequenz 5'→3'	°C
Pstprobe_fw	fw	2569	CAT CCT GGG TAA ATG GCC TC	56°C
Probesig1_rev	rev	2316	CAA CAG TCA TTT AAT TCA TTT TTG	56°C
Probesig2_fw	fw	2317	GAA ATA GCC GGG ACT TAG GG	56°C
3'NCOshort_rev	rev	2591	CTG TAA AGA CAG AAA AAG GAG	56°C
newprobe1_fw	fw	3240	CTG GAG CAG AAT AAA TTT CAA AG	58°C
probe_Ex4_fw	fw	3358	CAT AGT ACT AGG GTG CCT AAC	60°C
probe_Ex4a_rev	rev	3359	CTG TAT ACT GCC ACC TAG TTG G	60°C
probe_Ex4b_rev	rev	3360	G TTT AAC TTT CAT TGG GCT GG	60°C
neoprobe_fw	fw	3220	TGA ATG AAC TGC AAG ACG AGG CA	58°C
neoprobe_rev	rev	3221	GCC GCC AAG CTC TCA GCA ATA T	58°C

2.6.7.4 Primer für die Genotypisierung (siehe auch Tabelle 2.4)

Bezeichnung		Nr.	Sequenz 5'→3'	°C
Sal_fw	fw	2158	GGC GGA AAG AAC CAG CTG GGG	58°C
PPFKO_fw	fw	2378	GAA GAC AAT AGC AGG CAT GCT G	60°C
Box1in_rev	rev	2374	GTT AGG CAC CCT AGT ACT ATG	60°C
Box2intern_fw	fw	2393	GCA GAA TCC TTA CCA TAC AAC C	56°C
PPFBox1_fw	fw	2375	GGC TTT ACA CTT TAT GCT TCC G	60°C
PPFseqBox1_rev	rev	2395	CGG TAG AAG TTC CTA TAC TTT C	60°C
PPFBox2_rev	rev	2377	GAG GCT TTT TGC TTC CTC TTG	60°C
Box2in_rev	rev	2619	CAA CCT AGT TAA CCC TGT GAG	60°C
Box2lox_rev	rev	2618	GGT TCC AGT AAT TTT ACA TGG	58°C
#1114 forw IRES	fw	1114	GAT GCC CAG AAA GTA CAC CAT TGT ATG GG	64°C
#1117 rev LacZ	rev	1117	CAC CCA CCG GAA CAA GAC CGC C	64°C
hum SMN2 EX2bfw	fw	2713	GTA AAC CAA AAA CCA CAC CTA AA	63°C
hum SMN2 EX3 rev	rev	2714	GGG AAA GTA GAT CGG ACA GA	63°C
GNA3	fw	2647	CAA GGC GAT TAA GTT GGG TAA CG	64°C
GMS11	rev	2648	GGC CTG GAA TTC AAT ATG CTA GAC TGG CC	64°C
m_smn forw	fw	2649	CCG GGA TAT TGG GAT TGT AG	55°C
m_smn rev	rev	2650	TTC TTT TGG CTT TTA TTC TTC TTG	55°C
NFL-Prom-forw	fw	1076	GCA AAG TGG AAA GGA CGA C	60°C
Htra_ex1/3Y_rev	rev	3147	GAA GCA GAA CGG GAT TTC C	60°C
#1837_SMNex6_F	fw	1837	ATA ATT CCC CCA CCA CCT C	55°C
#1841_hSMNex8rev	rev	1841	GCC TCA CCA CCG TGC TGG	55°C
Hb9EX1_2_fw	fw	2887	TGC CAG CAC CTT CCA ACT	56°C
Hb9Ex1_2_rev	rev	2888	CGG TGA GCA TGA GCG AGG TA	56°C
HPRT #3 for	fw	1037	AAG GAG ATG GGA GGC CA	55°C

HPRT #4 rev	rev	1038	GTT GAG AGA TCA TCT CCA CCA AT	55°C
SMN_ex7_FLf	fw	2075	GAA GGT GCT CAC ATT CCT TAA AT	62°C
SMN_ex8_r	rev	2076	ATC AAG AAG AGT TAC CCA TTC CA	62°C
SMN Ex 5 for	fw	1449	CCA CCA CCC CAC TTA CTA TCA	61°C
SMN Ex 6/8 rev	rev	1450	GCT CTA TGC CAG CAT TTC CAT A	61°C
Flptest1_fw	fw	3078	CGT ATA ATG TAT GCT ATA CGA AG	60°C
Flp_fw	fw	3099	TTA GTT CAG CAG CAC ATG ATG	56°C
Flp_rev	rev	3100	GGA GGA TTT GAT ATT CAC CTG	56°C
loxP_rev	rev	3101	CTT CGT ATA GCA TAC ATT ATA CG	60°C
Credel_fw	fw	3104	CGC ATA ACC AGT GAA ACA GCA T	58°C
Credel_rev	rev	3105	GAA AGT CGA GTA GGC GTG TAC G	58°C
mSig41ex7_rev	rev	2003	CATCATAACC CCGATCGTAC C	61°C
mSig41ex1_fw	fw	2154	GGA GTC ATG AGC GAC AGC GG	61°C
mSig41ex4_rev	rev	2155	GCT GTG GCG CCT GCG ATA ATC	61°C
mSig41ex1new_fw	fw	2249	GCG TCG CGC TAG GCT GCG GC	61°C
mSig41ex4new_rev	rev	2303	TCG GCT GTA AGA CCT GCT CCG	61°C
mSig41ex9_rev	rev	2250	GGT GAG TAG GAT CGT GAT CG	61°C
Hb9Cre_fw	fw	3140	GTC CAA TTT ACT GAC CGT ACA CC	60°C
Hb9Cre_rev	rev	3141	GTT ATT CGG ATC ATC AGC TAC ACC	60°C
KO_nesteda_rev	fw	3263	CAC CAG AAA ATT TAA CAA ATT AAA C	62°C
KO_nested_b_rev	rev	3264	GCT AAA GTC AGA GAG GGA AAT T	62°C
KO_nested_in_rev	rev	3265	CAA GTT ACT AAA ACT CCA CTG TC	62°C
neo1/box1_fw	fw	2507	GTA GTG AAG GTC TGT TAC CC	60°C
KO2_fw	fw	3482	AAG GCG TTC TAG ATC AAA GTC CAG	58°C
KO5_rev	rev	3487	AAT GTC AAA AGG TTC CAG TAA	58°C
mSmnEx5_fw_a	fw	3435	CTT CCT GCC GTG CTG GAT	61°C
mSMNEx8_rev_b	rev	3434	CAG AGC TGA ACT TCT TAA TTT G	68°C
mSmnEx5_fw_b	fw	3439	GTG CTG GAT GCC CCC GTT	60°C
mSmn-7_rev	rev	3440	GAC AGA GCT GAA CCA TAT AG	60°C
Rosa_1	fw	3590	AAA GTC GCT CTG AGT TGT TAT	60°C
Rosa_2	rev	3591	GCG AAG AGT TTG TCC TCA ACC	60°C
Rosa_3	rev	3592	GGA GCG GGA GAA ATG GAT ATG	60°C

2.6.7.5 Primer für *Realtime*-PCRs

Bezeichnung		Nr.	Sequenz 5'→3'	°C
Hb9Cre_fw	fw	3140	GTC CAA TTT ACT GAC CGT ACA CC	63°C
Hb9Cre_rev	rev	3141	GTT ATT CGG ATC ATC AGC TAC ACC	63°C
SfrsEx4_fw	fw	3218	TAG AAG GCA TTA TAC AAG	63°C
SfrsEx5_rev	rev	3219	CTC AAC CCA AAC ACG C	63°C
hmbs_ex5fw	fw	2196	GGA GAG AAG AGC CTG TTT ACC	61°C
hmbs_ex6rev	rev	2197	CAG ATG GCT CCA ATA GTA AAG	61°C
Htradetectshort_fw1	fw	2836	CCG AAG GCA TTA TAC CCG	65°C
Htradetectshort_rev1	rev	2841	CTC AGC CCA AAT ACT C	65°C
mIslet1_fw3	fw	3603	AGC CGC CCT GGA AAG TA	66°C
mIslet1_rev3	rev	3604	GTA TCT GGG AGC TGC GAG GAC AT	66°C
mSmnEx5_fw_a	fw	3435	CTT CCT GCC GTG CTG GAT	68°C
mSMNEx8_rev_b	rev	3434	CAG AGC TGA ACT TCT TAA TTT G	68°C
mSmnEx5_fw_b	fw	3439	GTG CTG GAT GCC CCC GTT	65°C
mSmn-7_rev	rev	3440	GAC AGA GCT GAA CCA TAT AG	65°C

2.7 Molekularbiologische Methoden

2.7.1 Bakterienkulturen und Isolierung von Plasmid-DNA

Die Bakterienkulturen wurden mit den entsprechenden Antibiotika entweder als Flüssigkulturen in LB-Medium oder auf LB-Agarplatten angeimpft. Die Zucht auf Agarplatten erfolgte 16 h bei 37°C im Brutschrank, bei Verwendung von Flüssigkulturen geschah dies in einem Schüttelinkubator (200 rpm, 37°C). Bei der Wiederanzucht von gelagerten Bakterienklonen wurde ein Abstrich der bei -80°C archivierten Kultursuspension über Nacht bei 37°C mit einer Impföse auf einer LB-Agar-Platte angeimpft. Zur Weiterzucht wurde stets ein einzelner Klon in LB-Medium überführt. Zur Archivierung von Bakterienklonen wurden 4/5 Vol. einer Flüssigkultur mit 1/5 Vol. 5x Einfriermedium gemischt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Plasmid-DNA wurde mit Hilfe spezieller Kits über Zellaufschluss mittels alkalischer Lyse (Birnboim and Doly 1979) und anschließender Plasmidaufreinigung mit Säulenchromatographie gewonnen. Zur Gewinnung kleiner DNA-Mengen (~5-10 µg) wurden ~25 ml LB-Medium mit der entsprechenden Bakterienkultur angeimpft und die resultierende ü.N.-Kultur mit dem „Plasmid Miniprep Kit Quantum Prep®“ nach Anweisungen des Herstellers präpariert. Zur Gewinnung größerer DNA-Mengen (~50-100 µg) wie z.B. zur Transfektion von ES-Zellen (2.9.5.1) wurde das „Endo Free® Plasmid Maxi Kit“ verwendet. Mit der Lyse von gramnegativen Bakterien können Endotoxine freigesetzt werden, die für eine weitere Verwendung der Plasmid-DNA in Zellkulturen inhibierend wirken können. Um optimale Wachstumseigenschaften der Kultur zu gewährleisten, wurde für diese Art der Präparation zunächst eine Vorkultur (25 ml) angeimpft und über 8 Stunden bei 37°C inkubiert. Von dieser Kultur wurden dann 5 ml in 110 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum überführt und 16 h inkubiert. Die Plasmidpräparation erfolgte wiederum nach den Instruktionen des Herstellers. Im Anschluss an die Elution der Plasmide wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion (2.7.3.3) durchgeführt.

2.7.2 Generierung rekombinanter Plasmide

Für die Generierung rekombinanter Plasmide wurde die gewünschte Zielsequenz zunächst mittels PCR (2.7.7) amplifiziert oder aus anderen Vektoren mittels endonucleolytischer Restriktion (2.7.9) ausgeschnitten und im Anschluss direkt (2.7.7.1) oder aus einem Agarosegel (2.7.4.2) aufgereinigt. Transformierte Bakterienkolonien wurden zur Überprüfung der erfolgreichen Insertion des klonierten Fragmentes in 20 µl *Aqua dest*. gebracht und 5 µl des Zelllysats als

Matrize für eine Test-PCR verwendet. Die Primer für solche „Kolonie-PCRs“ wurden stets so gewählt, dass nur Klone erfasst wurden, die das Fragment in richtiger Orientierung trugen. Das verbleibende Zelllysat wurde nach dieser Bestätigung zum Animpfen einer Flüssigkultur verwendet, welche zur Gewinnung der Plasmid-DNA diente.
Alle Konstrukte wurden weitergehend mit Testrestriktionen und daraufhin mit Sequenzierungen (2.7.5) überprüft und verifiziert.

2.7.2.1 Generierung rekombinanter TOPO-Vektoren („TA-Klonierung“)

Die PCR-Produkte, welche zur Generierung des *targeting*-Konstruktes pRF-*Sfrs10* verwendet wurden, wurden in TOPO-Vektoren zwischenkloniert. Über entsprechende Primer waren diese PCR Produkte 5’ mit Restriktionsschnittstellen für spezifische Endonucleasen modifiziert worden, die schließlich der Einklonierung in den *targeting*-Vektor dienen sollten.
Für die KO-Region mit einer Größe von 621 bp wurde für die Zwischenklonierung „pCR2.1®-TOPO“, für die flankierenden Rekombinationsarme (5’-Box ~3,1 kb und 3’-Box ~5,2 kb) „pCR®-XL-TOPO“ nach den Instruktionen des Herstellers verwendet. Das sogenannte TA-Klonierungssystem macht sich die Sequenz-unabhängige terminale Transferase-Aktivität von Taq-Polymerasen zunutze. Das Enzym addiert ein einzelnes Deoxyadenosin an das 3’-Ende von PCR-Produkten. Die linearisierten TOPO-Vektoren hingegen tragen ein überhängendes 3’-Deoxythymidin.

2.7.2.2 Generierung des *Sfrs10-targeting*-Vektors pRF-*Sfrs10*

Bei allen Klonierungsschritten zur Generierung des pRF-*Sfrs10* mit einer finalen Größe von ~16 kb wurde auf besondere Reinheit und schonendste Aufbereitung der zu klonierenden Fragmente und des Zielvektors geachtet. Ferner wurden die aufgereinigten Komponenten zur Klonierung stets zeitnah weiterverarbeitet.
Die einzelnen zwischenklonierten Fragmente zur Generierung des pRF-*Sfrs10* wurden mit den Restriktionsendonucleasen, mit deren Erkennungssequenz sie per PCR-Primer modifiziert worden waren (siehe Tabelle 3.1), aus den TOPO-Vektoren (Restriktion von 5 µg) ausgeschnitten und auf einem Agarosegel vom Vektor separiert. Die entsprechenden Fragmentbanden wurden ausgeschnitten und per „QIAEX® Gel Extraction Kit“ oder per „S.N.A.P.™ UV-free Purification Kit“ aufgereinigt. Ein Aliquot der eluierten DNA-Fragmente wurde auf einem Agarosegel kontrolliert. Der Zielvektor (Restriktion von 5 µg) wurde vor der Ligation mit demselben Restriktionsenzym linearisiert, mit welchem auch das zu klonierende Fragment aus dem

TOPO-Vektor ausgeschnitten worden war. Der Zielvektor wurde daraufhin 10 min bei 37°C mit 2 U alkalischer Phosphatase inkubiert. Das Enzym dephosphoryliert die 5'-Enden einer DNA-Sequenz und verhindert so die Religation von linearisierten Vektoren. Sowohl die einzuklonierenden Fragmente als auch der dephosphorylierte Vektor wurden nun mit der Phenol-Chloroform-Methode aufgereingt – im Fall des Vektors diente dies auch der Inaktivierung der alkalischen Phosphatase. Die aufgereinigten Komponenten wurden in gleichen Mengen nebeneinander auf einem Agarosegel aufgetragen, um die Konzentrationsverhältnisse bei der Ligation abschätzen zu können. Dabei sollte die Anzahl an Vektor- und Fragmentmolekülen in etwa gleich, mit einem leichten Überschuss des zu inserierenden Fragments sein. Die Ligation erfolgte ü.N. bei 16°C oder 4 h bei 17°C unter Inkubation mit 5 Weiss-Units der T4-Ligase. Es wurden stets mehrere Ligationsansätze mit einem Endvolumen von 15 µl und unterschiedlichen Verhältnissen von Vektor zu Fragment angesetzt. Die Transformation erfolgte per Elektroporation in elektrokompetente DH5α-Zellen. Die Ligationsansätze wurden hierzu auf Eis jeweils komplett zu je 20 µl „Elektro Max ™ DH5α-E™" pipettiert und in eine Elektroporationsküvette (0,1 cm) gegeben. Die Küvetten wurden auf Eis vorgekühlt und unmittelbar vor dem Elektroschock getrocknet. Der Elektroschock erfolgte mit einem Elektroporator auf dem „Bakterien-Modus" (25 µF; 1,8 kV; 4 msek). Daraufhin wurden 250 µl S.O.C-Medium hinzugegeben und die Zellen 1 h bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Schließlich wurden von dem Transformationsansatz 100-200 µl auf einer LB-Agar-Platte ausgestrichen und ü.N. bei 37°C inkubiert. Die angezüchteten Bakterienkolonien wurden nun einzeln mit einer Impföse abgestrichen und – wie beschrieben (2.7.2) – in Kolonie-PCRs getestet.

2.7.3 Isolation genomischer DNA

2.7.3.1 Isolation genomischer DNA aus Gewebe

Die Gewebe wurden entweder sofort nach der Entnahme oder auch nach Lagerung (-80°C) in Lysispuffer überführt und ü.N. bei 55°C und 600 rpm im Schüttelheizblock inkubiert. Die Gewebelysate wurden im Anschluss 20 min bei 13.000 rpm in einer Tischzentrifuge sedimentiert, der Überstand in Isopropanol überführt und die DNA 30-60 min bei Raumtemperatur präzipitiert. Nach erneuter Zentrifugation, Verwerfen des Überstandes und Waschen des Präzipitats mit 70%igem Ethanol wurden die DNA-Pellets getrocknet und in einem adäquaten Volumen an TE^{-4}/RNase resuspendiert. War für nachfolgende Verfahren ein hoher Reinheitsgrad der DNA erforderlich, so wurde diese mittels Phenol-Chloroform extrahiert (2.7.3.3)

2.7.3.2 Isolation genomischer DNA aus Zellen

Zur Gewinnung von DNA aus Zellen wurde das Medium entnommen, die Zellen mit PBS gewaschen und trypsinisiert. Nach 10minütiger Sedimentation der Zellen bei 13.200 rpm und einem erneuten Waschschritt mit PBS wurde das Zellpellet direkt in Lysispuffer resuspendiert. Darauf wurde wie unter 2.7.3.1 beschrieben verfahren.

2.7.3.3 Phenol-Chloroform-Extraktion

Phenol bindet über Ausbildung von Wasserstoffbrücken und hydrophoben Wechselwirkungen mit Aminosäuren denaturierte Proteine, so dass diese mit der Phenol-Chloroform-Extraktion aus Nucleinsäurelösungen entfernt werden können. Mit anschließendem Zentrifugieren sedimentieren die Proteine in der unteren organischen Phenolphase, während die DNA in der oberen wässrigen Phase verbleibt. Das Chloroform dient der vollständigen Entfernung des Phenols. Um Proteine aus Nucleinsäurelösungen zu entfernen, wurde der Überstand des Zelllysats in ein „Phase Lock Gel™ Heavy“ Reaktionsgefäß mit einem 1:1-Gemisch von Phenol und Chloroform (1:24 mit Isoamylalkohol gemischt) versetzt, 5 min in einem Rotator bei RT inkubiert und 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Wegen der separierenden Gelphase in dem verwendeten Reaktionsgefäß konnte die obere DNA-haltige Phase von der unteren organischen Phase leicht isoliert werden. Die obere Phase wurde in ein neues „Phase Lock Gel™ Heavy“ überführt und mit einem Volumen Chloroform versetzt, gemischt und zentrifugiert. Die so aufgereingte DNA-haltige Phase konnte nun in 3 Vol. eiskaltem 100%igen EtOH und 1/10 Vol. 3 M Natriumacetat pH 5,2 über Nacht bei -20°C gefällt werden. Daraufhin wurde die DNA 20 min

bei 13.000 rpm sedimentiert, nach Verwerfen des Überstandes mit 70%igem EtOH gewaschen und schließlich nach erneutem Verwerfen des Überstandes und Trocknen des Pellets in einem adäquaten Volumen an TE^{-4}/RNase resuspendiert.
Die Methode diente auch der Aufreinigung extrahierter Plasmid-DNA vor Ligationen (2.7.2.2) oder vor Transfektionen von ES-Zellen (2.9.5.1).

2.7.4 DNA-Elektrophorese

Die Eigenschaft von DNA, wegen ihrer negativen Ladung im elektrischen Feld zu wandern, wird bei der gelelektrophoretischen Trennung von DNA-Fragmenten genutzt. Hierbei werden DNA-Proben auf eine elektrisch neutrale Gelmatrix (Agarose, PAA) gebracht, welche wegen ihrer Struktur wie ein Molekularsieb wirkt. Die Porenstärke hängt hierbei von der Konzentration der verwendeten Gelsubstanz ab und beeinflusst damit die Wanderungseigenschaften unterschiedlich großer DNA-Fragmente. DNA-Fragmente bewegen sich im elektrischen Feld mit einer Geschwindigkeit, die umgekehrt proportional zu dem Logarithmus ihres Molekulargewichtes ist. Weiterhin hängt die Wanderungsgeschwindigkeit von der angelegten Spannung ab.

2.7.4.1 Agarosegel-Elektrophorese und Ethidiumbromidfärbung

Die Konzentration der Agarosegele (0,7-3%) wurde nach der Größe der aufzutrennenden Fragmente gewählt. Das Agarosepulver wurde in 1x TBE in einer Mikrowelle aufgekocht bis eine klare Lösung vorlag. Nach Abkühlen der Flüssigkeit auf 50-60°C wurde dieser Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 1 µg/ml zugefügt und schließlich luftblasenfrei in einen Gelträger mit Kämmen gegossen. Auf diese Weise bildeten sich in dem erstarrten Gel Taschen, in welche schließlich die DNA-Proben eingebracht werden konnten. Die Proben wurden zuvor mit 1/10 Vol. Blaumarker versetzt, welcher zum einen das Einsinken der Proben in die Tasche, zum anderen das visuelle Verfolgen der Lauffront ermöglichte. Das Gel wurde zuvor vollständig mit Laufpuffer (1x TBE) bedeckt und schließlich – je nach Gelgröße und Anwendung der Methode – bei 25-140 V über 1-16 h belassen. Die Laufzeit richtet sich einerseits nach der Größe der zu analysierenden Fragmente, zum anderen nach der Gelkonzentration. Abschließend erfolgte eine fotografische Dokumentation der DNA-Fragmente an einem UV-Licht-Transluminator (366 nm). Ethidiumbromid interkaliert zwischen die Basen der DNA und fluoresziert unter UV-Licht intensiv, so dass diese visualisiert werden kann.

2.7.4.2 Aufreingung von DNA aus Agarosegelen

Die Aufreinigung von elektrophoretisch aufgetrennten DNA-Fragmenten aus Agarosegelen (Vogelstein and Gillespie 1979) erfolgte mittels des „QIAEX® Gel Extraction Kit“ und wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Zur besonders schonenden Aufreinigung von DNA-Fragmenten wie vor Klonierungsschritten, wurde die DNA mittels des „S.N.A.P.™ UV-free Purification Kits“ aufgereinigt. Bei dieser Methode wird zur Färbung der DNA Kristallviolett statt Ethidiumbromid verwendet. Letzteres schädigt die DNA zum einen über Interkalation, zum anderen mit UV-Licht, in welchem es visualisiert wird.
Die Methode diente der Aufreinigung von PCR-amplifizierten DNA-Fragmenten (2.7.7) oder der Aufreinigung nach der Restriktion von Vektoren (2.7.9) vor Klonierungen.

2.7.4.3 Polyacrylamid(PAA)-Gelelektrophorese und Silberfärbung

Für die PAA-Gelelektrophorese wird das Monomer Acrylamid mit dem Quervernetzungsreagenz N, N’-Methylenbisacrylamid co-polymerisiert.
Die DNA-Proben wurden mit Probenpuffer versetzt, 5 min bei 95°C denaturiert und in die Geltaschen eingebracht. Die Elektrophorese erfolgte auf einem Gel mit einer Länge von 15 cm über 3 h bei 8 mA.
Die Silberfärbung (Budowle et al. 1991) von PAA-Gelen ist zur Detektion von DNA-Fragmenten wesentlich sensitiver als die Visualisierung auf EtBr-gefärbten Agarosegelen. Die Methode ist somit auch zur Visualisierung von gering konzentrierten DNA-Fragmenten geeignet und beruht auf der Reduktion DNA-gebundener Silberionen.
Jeder Arbeitsschritt wurde unter Schwenken des Gels auf einem Schwenkinkubator durchgeführt. Das Gel wurde zunächst 15 min in 10%igem Ethanol fixiert, darauf eine Minute mit*Aqua dest*. gewaschen und mit 1%iger Salpetersäure 15 min angesäuert, womit die anschließende Bindung der Silberionen verbessert wurde. Nach erneutem Waschen wurde das Gel 10 min mit der Silbernitratlösung inkubiert, darauf fünfmal jeweils 1 min mit *Aqua dest*. gewaschen und schließlich zur Reduktion der DNA-gebundenen Silberionen im basischen Milieu mit Natriumcarbonat/Formaldehyd inkubiert. Hierbei wurde zunächst mit 50 ml der Lösung vorentwickelt und nach kurzem Waschen mit weiteren 200 ml inkubiert, bis eine deutliche Färbung der DNA-Fragmente beobachtet werden konnte. Die Signale wurden schließlich mit 5minütiger Inkubation in 10%iger Essigsäure fixiert. Abschließend wurden die Gele auf einem Filterpapier bei 80°C über 2 h auf einem Vakuum-Geltrockner getrocknet.

2.7.5 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung nach Sanger (Sanger et al. 1977) wurde zur Verifizierung von PCR-Produkten sowie von klonierten Konstrukten verwendet. Beim Durchlaufen des Sequenzierprogramms wird hierbei die DNA zunächst denaturiert, um die Hybridisierung eines Sequenzierprimers zu ermöglichen. Von diesem ausgehend erfolgt die Synthese des komplementären Stranges, wobei wegen der im Reaktionsansatz vorhandenen ddNTPs Produkte verschiedener Länge entstehen, deren 5'-Ende jeweils von dem verwendeten Sequenzierprimer gebildet wird. Die Produkte werden schließlich in einer Kapillare aufgetrennt und mit dem an den ddNTPs-gebundenen Fluorphor *via* Laser detektiert. Das Ergebnis wird in einem Ferrogramm dargestellt. Die Aufreinigung der zu sequenzierenden Produkte nach Durchlaufen des Sequenzierprogramms mittels Gelfiltration mit Sephadex G 50 als Säulenmaterial sowie die Sequenzierungen wurden durch den Sequenzierservice in der Genetik der Universität zu Köln durchgeführt.

<u>**Sequenzier-Ansatz:**</u>	<u>**Sequenzierprogramm:**</u>	
x µl Matrizen-DNA (400-600 ng Plasmid-DNA, 2-8 ng genomische DNA, 2-4 µl PCR-Produkte)	30 sek/95°C	
x µl Sequenzierprimer (10 pmol)	10 sek/95°C	24 Zyklen
3 µl 5x Sequenzierungspuffer	5 sek/50°C	24 Zyklen
1 µl BigDye-Mix V1.1	4 min/60°C	24 Zyklen
ad 20 µl *Aqua dest.*		

2.7.6 DNA-Quantifizierung

Die Pyrimidin- und Purinbasen der DNA absorbieren ultraviolettes Licht bei einer Wellenlänge von maximal 258 bis 260 nm. Diese Eigenschaft der DNA wird bei der Konzentrationsbestimmung einer DNA-haltigen Lösung genutzt, indem die Extinktion mit einer photometrischen Messung bestimmt wird. In einer Küvette von 1 cm Schichtdicke mit einer DNA-haltigen Lösung entspricht eine OD_{260} von 1 (optische Dichte bei 260 nm) einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml (Kaiser and Hogness 1960). Proteine hingegen absorbieren UV-Licht bei einer Wellenlänge von 280 nm. Mit Messung der OD bei 280 nm und Ermittlung des Quotienten der Messungen bei 260 und 280 nm (260/280 nm) ist es möglich, den Verunreinigungsgrad einer DNA-haltigen Lösung zu bestimmen. Hierbei zeigt eine nahezu proteinfreie Lösung einen Quotienten 260 nm/280 nm, von 1,8 bis 2, während dieser kleiner als 1,8 ist, falls Verunreinigungen mit Proteinen vorliegen. Ein Quotient größer 2 weist auf RNA-Rückstände hin.

Die zu messenden DNA-Lösungen wurden jeweils in TE^{-4} verdünnt (1:20) und deren Konzentrationen am Photometer bestimmt, wobei der Leerwert mit reinem Puffer erfolgte. Alternativ wurde die DNA-Konzentration mit Messung von 1,5 µl der unverdünnten DNA-Lösung an einem NanoDrop-Spektrophotometer ermittelt.

2.7.7 Die Polymerasekettenreaktion

Mittels der 1983 von Karl Mullis entwickelten Polymerase Ketten Reaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) lassen sich spezifische DNA-Sequenzen äußerst effektiv amplifizieren (Saiki et al. 1988; Saiki et al. 1985). Das Prinzip dieser Methode beruht auf einer enzymatischen *in vitro*-Amplifikation eines DNA-Abschnitts, welcher von zwei sequenzspezifischen, gegenläufig orientierten Oligonucleotid-Startermolekülen (Primern) flankiert wird. Ausgehend von den 3'OH-Enden der Primer werden mit einer DNA-Polymerase die jeweils komplementären DNA-Stränge synthetisiert.

Der Syntheseverlauf einer PCR erfolgt zyklisch in drei Schritten:

1. Hitzedenaturierung der Matrizen-DNA (95°C)
2. Primer-Hybridisierung (40-65°C)
3. Synthese der Komplementärstränge mit der Taq-DNA-Polymerase (72°C)

Das im Folgenden gezeigte Schema gibt eine Übersicht eines allgemeinen PCR-Ansatzes und der PCR-Bedingungen, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Allgemeiner PCR-Ansatz:	**Allgemeine PCR-Bedingungen:**	
x µl DNA (20-200 ng gDNA, 100-500 pg Plasmid-DNA)	10 min Hitzedenaturierung bei 95°C	
1 µl Primer fw (10 pmol)	30 sek/95°C	25-50 Zyklen
1 µl Primer rev (10 pmol)	30 sek/50-65°C	
2,5 µl 10xPCR-Puffer	x min/72°C	
4 µl dNTP-Mix (je 200 µM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	10 min/72°C	
0,2 µl Taq-Polymerase (1 U)		
ad 25 µl *Aqua dest*.		

Die PCR wurde in der vorliegenden Arbeit zur Amplifikation von zu klonierenden Fragmenten und zur Kontrolle auf deren erfolgreiche Aufnahme in Bakterien verwendet. Für die Amplifikation von größeren Fragmenten (>2 kb) wurde eine *proofreading*-Polymerase nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Hierbei wurde das Gesamtvolumen des PCR-Ansatzes auf 50 µl erhöht und die Extension mit der Polymerase in den letzten 25 Zyklen um je 20 sek pro Zyklus verlängert. Ferner diente die Methode der Genotypisierung von Mäusen und Zellen, der Amplifikation von Sonden zur Hybridisierung von *Southern Blots* und der Amplifikation verschiedener cDNAs.

2.7.7.1 Aufreinigung von PCR-Fragmenten

Das „QIAquick® PCR Purification Kit“ wurde zur Aufreinigung von PCR-Produkten eingesetzt, welche z.B. ihre Verwendung als Sonden in *Southern Blot*-Analysen (2.7.10.2) fanden. Die Methode dient der Beseitigung potentiell inhibierender Rückstände der vorhergegangenen PCR auf nachfolgende Techniken und ist zur Aufreinigung von PCR-Produkten von 100 bp bis 10 kb geeignet.

2.7.8 Amplifikation genomischer DNA

Bei wichtigen zu analysierenden Proben mit nur wenig Ausgangsmaterial wurde die genomische DNA mittels des „Repli-g® whole genome amplification Kit Mini“ vor der eigentlichen PCR amplifiziert. Die Anwendung erfolgte nach Herstellerangaben und wurde für die Amplifikation von genomischer DNA von Blastocysten und Embryonen an E7.5 verwendet.

2.7.9 Fragmentierung von DNA mit Restriktionendonucleasen

Restriktionsendonucleasen, die DNA an kurzen Erkennungssequenzen über Hydrolyse der Phosphodiesterbindungen zwischen zwei Basen zu trennen vermögen, werden in der Molekularbiologie eingesetzt, um DNA gezielt an spezifischen Stellen zu spalten und so in definierte Fragmente zu zerlegen (Nathans and Smith 1975). Diese Enzyme wurden in der vorliegenden Arbeit für Testrestriktionen von klonierten Vektoren oder zur Separierung zwischenklonierter Fragmente für weitere Klonierungsschritte verwendet. Für diese Anwendungen wurden 2-5 µg Plasmid-DNA über 2-4 h mit dem jeweiligen Enzym inkubiert.

Weiterhin wurden diese Enzyme zur Restriktion genomischer DNA beispielsweise für *Southern Blot*-Analysen eingesetzt. Hierbei wurden 5-20 µg genomischer DNA über Nacht mit dem jeweiligen Enzym inkubiert, wobei dem Reaktionsgemisch neben dem vom Hersteller empfohlenen 10x-Puffer stets DTT und Spermidin in einer Endkonzentration von 1 mM sowie BSA zugesetzt wurde. Für beide Anwendungen wurde ein Gesamtansatz von 50 µl gewählt und dieser im Wasserbad bei adäquater Temperatur inkubiert.

2.7.10 *Southern Blot*-Analysen (Southern 1975)

Mittels eines *Southern Blots* lassen sich elektrophoretisch aufgetrennte DNA-Fragmente auf eine Nylonmembran transferieren und im Anschluss mit spezifischen Sonden visualisieren. Die Methode wurde zur Detektion positiv transfizierter ES-Zell-Klone und zur Genotypisierung von Mäusen verwendet. Hierzu wurden 5-20 µg genomischer DNA mit Restriktionsendonucleasen (2.7.9) fragmentiert, darauf mit 1/10 Vol. Probenpuffer versehen und neben einem Größenstandard in die Taschen eines 0,7%igen Agarosegels eingebracht. Die DNA-Proben wurden zum Einlaufen in die Gelmatrix 15 min bei 70 V belassen und die Fragmente über Nacht bei 20-30 V elektrophoretisch getrennt. Die im Gel getrennten DNA-Fragmente, welche als uniforme Bahn sichtbar waren, wurden unter UV-Licht fotografiert und der Größenstandard im Gel mit einer Pipettenspitze markiert.

2.7.10.1 *Southern Blot* – Transfer von DNA-Fragmenten auf eine Nylonmembran

Die im Gel getrennten DNA-Fragmente wurden auf eine Nylonmembran tranferiert. Dazu wurde die DNA zunächst unter 10minütigem Schwenken des Gels in 0,125 M HCl auf einem Inkubator depuriniert. Nach 20minütiger Inkubation des Gels mit 0,4 M NaOH zur DNA-Denaturierung wurde der *Southern Blot* luftblasenfrei aufgebaut. Die Nylonmembran wurde zuvor mit *Aqua dest.* befeuchtet und vor dem unmittelbaren Gebrauch (wie auch die Filterpapiere) mit 0,4 M NaOH getränkt. Zur Entfernung anhaftender Agarose-Reste wurde die Nylonmembran 16 Stunden nach Aufbau des *Southern Blots* mit 2x SSC gewaschen. Die transferierte DNA wurde dann mit 2stündiger Inkubation bei 80 °C auf der Membran fixiert. Die so getrocknete Membran konnte nun gelagert (RT) oder direkt mit einer radioaktiv markierten Sonde hybridisiert werden.

2.7.10.2 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten

Vor der radioaktiven Hybridisierung (Wahl et al. 1987; Wetmur 1991) wurde die Membran mit 2x SSC befeuchtet, in eine Glasröhre gebracht und zur Absättigung unspezifischer Bindestellen 2-4 h bei 65°C mit der Prähybridisierungslösung im Drehinkubator inkubiert. Zur Denaturierung der in der Prähybridisierungslösung enthaltenen Salm-Spermien-DNA wurde die Lösung vor Gebrauch 10 min auf 100°C erhitzt und darauf 5 min auf Eis abgekühlt, bevor die Membran mit dieser prähybridisiert wurde.

Zur Detektion spezifischer DNA-Fragmente wurden DNA-Sonden per PCR amplifiziert und anschließend aufgereinigt (2.7.7.1). Die Spezifität der entsprechenden Sonden wurde vor ihrer Anwendung mit Test-*Blots* an genomischer DNA wildtypischer Mäusen getestet. Die radioak-

tive Markierung der Sonden erfolgte mit dem „Rediprime™II Random Prime Labeling System"-Kit, welches auf dem *random primed oligolabeling* (Feinberg and Vogelstein 1984) basiert. Das Kit wurde nach Instruktionen des Herstellers gebraucht. Als Radioisotop wurde α-[^{32}P]-dCTP verwendet.

Um überschüssige Nucleotide zu entfernen, wurde die DNA-Sonde nach Beenden der 10minütigen Inkubationszeit 3 min bei 3000 rpm über eine Sephadex- Säule (Probe Quant G50 micro columns) zentrifugiert und nach Denaturierung und Abkühlung auf Eis (je 5min) direkt zu der Prähybridisierungslösung pipettiert. Nach 16stündiger Inkubation bei 65°C im Drehinkubator wurde die Sonde entnommen und unspezifisch an die Membran gebundene Radioaktivität mittels einmaliger kurzer und 2-3maliger 20minütiger Inkubation mit dem Waschpuffer (vorgewärmt auf 65°C) entfernt. Die Radioaktivität der Membran wurde zwischen den Waschschritten stets mit einem Geigerzähler kontrolliert, um ein Abwaschen der gebundenen Sonde zu vermeiden. Schließlich wurde die Membran bei Erreichen der gewünschten Signalstärke (je nach Probenanzahl 30-80 Becquerel) in Folie eingeschweißt und in eine Röntgenkassette eingeklebt. Nach Auflegen eines Röntgenfilmes erfolgte die Autoradiographie bei -80°C.

Für den Fall, dass dieselbe Membran mit einer anderen Sonde markiert werden sollte, wurde die hybridisierte Sonde mit 20minütigem Erhitzen in der entsprechenden Waschlösung (*Southern Strip*) entfernt. Nach der Prähybridisierung konnte die auf der Membran fixierte DNA dann, wie beschrieben, erneut mit einer radioaktiv markierten Sonde hybridisiert werden.

Tabelle 2.1 gibt eine Übersicht der in dieser Arbeit für *Southern*-Analysen verwendeten Restriktionsendonucleasen und Sonden sowie die PCR-Bedingungen für deren Amplifikation.

Tabelle 2.1: Verwendete Restriktionsenzyme und Sonden für *Southern*-Analysen

Detektion	Endonuclease	Sonde/Primer/°C	Fragmentgröße/n
Sfrs10: homolog-rekombinante ES-Zellen, Keimbahntransmission und *Neo*-deletion	Pst I	5'-Sonde: 2569/2316; 56°C; 797 bp Fragment;	wt = 8,4 kb; rk = 4,7 kb; -neo (FL) = 4kb; KO = 7,8 kb
Sfrs10: homolog-rekombinante ES-Zellen; Keimbahntransmission	Nco I	3'-Sonde: 2317/2591; 56°C; 500 bp Fragment	wt = 12 kb; rk = 7,6 kb
Neo-Transgen: homologe Rekombination von ES-Zellen und Keimbahntransmission	Pst I oder Sac I	Neo-Sonde: 3220/3221; 58°C; 533 bp Fragment	rk = 1,2 kb (Pst I) rk = 7,4 kb (SacI)
Sfrs10: Ex4-Deletion (*knock-out*)	Nsi I	KO-Sonden: 3358/3359 oder 3358/3360; 60°C; 578 bp oder 1 kb Fragment	wt = 5,5 kb; KO = 4,9 kb: FL = 5.6 kb

2.7.11 RNA-Isolation

Die Arbeiten mit RNA wurden zur Vermeidung von Kontaminationen mit RNasen mit RNase-freien Materialien und Geräten durchgeführt. Dem zur RNA-Resuspension verwendeten Wasser wurde DEPC zugefügt, welches RNasen zerstört.

2.7.11.1 RNA-Isolation aus Geweben

Die Gewebe wurden unmittelbar nach Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zu ihrer weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Bis zu 20 mg eines Gewebestückes wurden zur RNA-Isolation mit dem „RNeasy® Mini Kit“ verwendet. Die Gewebestücke wurden direkt in 600 µl RLT-Lysispuffer (Bestandteil des Kits) mit einem „ULTRA-TURRAX®“ homogenisiert. Das Gerät wurde zwischen der Verwertung einzelner Proben stets sorgfältig gereinigt (1% SDS, 70% EtOH, *Aqua dest*.). Das Lysat wurde mit „QIAshredder“ nach Angaben des Herstellers weiter homogenisiert – diese spezielle Säule reduziert die von DNA verursachte Viskosität der Probe, welche die RNA-Isolation mit dem „RNeasy®Kit“ stören könnte. Die weitere RNA-Isolierung erfolgte nach Anweisungen des Herstellers, wobei zur völligen Entfernung von DNA ein Inkubationsschritt mit dem „RNase-Free DNase set“ durchgeführt wurde. Die RNA-Elution erfolgte in bis zu 50 µl RNase-freiem Wasser.
Bei Verwendung fettreicher Gewebe wie Gehirn oder Rückenmark erfolgte die Gewebe-Homogenisierung in „QUIAzol“ nach Herstellerangaben. Die weitere Aufarbeitung wurde ebenfalls mit „QIAshredder“ und dem „RNeasy® Mini Kit“ durchgeführt.

2.7.11.2 RNA-Isolation aus Zellen

Die RNA-Isolation erfolgte mit dem „RNeasy® Mini Kit“. Nach Abnahme des Mediums wurde der beigefügte Lysispuffer direkt auf die Zellen gegeben. Weiterhin wurden für die RNA-Isolation aus Zellen „QIAshredder“ und das „RNase-Free DNase Set“ verwendet. Die einzelnen Arbeitsschritte erfolgten nach den Instruktionen des Herstellers.

2.7.12 RNA-Quantifizierung

In einer Küvette von 1 cm Schichtdicke mit einer RNA-haltigen Lösung entspricht eine OD_{260} von 1 (optische Dichte bei 260 nm) einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml.
Die Konzentration von RNA für eine weitere Verwendung in nicht-quantitativen PCRs wurde an einem NanoDrop-Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen, wobei je 1,5 µl der unverdünnten Probe verwendet wurden. Auch das Verhältnis der Absorption bei

260 nm zu der Absorption bei 280 nm Wellenlänge wurde ermittelt – dieses sollte für reine RNA zwischen 1,8 und 2,1 liegen, wobei niedrigere Werte Proteinkontaminationen und höhere Werte RNA-Degradierungen oder freie Nucleotide indizieren.
Die äußerst exakte fluorimetrische Bestimmung von RNA-Konzentrationen wurde stets verwendet, wenn die Proben mittels *Realtime*-PCR gemessen werden sollten. Die Methode ist um ein vielfaches sensitiver als die photometrische RNA-Konzentrationsbestimmung. Hierbei werden keine Kontaminanten wie Proteine oder freie Nucleotide detektiert. Die Quantifizierung mit dem – nach Herstellerangaben verwendeten – „RiboGreen® RNA Quantification Kit“ beruht auf der fluoreszierenden Eigenschaft von an RNA-gebundenem *RiboGreen*, während dieses ungebunden nicht fluoresziert. Zur Quantifizierung der RNA wurde die Fluoreszenz des RNA-gebundenen *RiboGreens* mit einem „TECAN Safire^2“ detektiert.

2.7.13 Reverse Transkription (RT-PCR)

Mit der reversen Transkription wird einzelsträngige mRNA mittels einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase in doppelsträngige cDNA umgeschrieben. Diese kann dann mit weiterführenden Analysen z.B. in PCR-Reaktionen untersucht werden.
Für Quantifikationen von Transkripten mittels der *Realtime*-PCR wurde zur cDNA-Synthese das „QuantiTect® Reverse Transcription Kit“ nach Herstellerempfehlungen verwendet. Es wurde je nach RNA-Konzentration 100 oder 150 ng RNA in einem Endvolumen von 10 µl umgeschrieben. Für nicht-quantitative Anwendungen wurden 500 ng bis 1,2 µg RNA mit der „Superscript II Reverse Transciptase“ bei 42°C eine Stunde zu cDNA umgeschrieben. Diese konnte direkt als PCR-Matrize eingesetzt werden.

<u>RT-Ansatz mit Superscript II:</u>

0,4 Vol. RNA (bis 1,2 µg) + *Aqua dest*.
0,5 Vol. RT-Mix
0,05 Vol. Oligo-dTs
0,025 Vol. Superscript II
0,025 Vol. RNase-Inhibitor
10-30 µl End-Volumen

2.7.14 Quantitative *Realtime*-PCR

Die Methode der *Realtime*-PCR (RT; „Echt-Zeit-PCR“) beruht auf dem Prinzip einer herkömmlichen PCR, ermöglicht jedoch zusätzlich eine wesentlich präzisere Quantifizierung der eingesetzten DNA- oder RNA-(cDNA)Matrize. Die Quantifizierung erfolgt hierbei mit Fluoreszenzmessungen eines DNA-bindenden Farbstoffes (z.B. SYBR-Green) während eines PCR-Zyklus, so dass während der Messung die Menge eines Amplikons nach jedem Zyklus („in Echt-Zeit“) erfasst werden kann – dieser Schritt am Ende jedes Zyklus erfolgt bei 78-80°C. Die gemessene Fluoreszenz ist dabei proportional zur Amplikonmenge. Mit einer speziellen Computersoftware können die während des Laufes aufgezeichneten Kurven ausgewertet werden. Die eigentliche Quantifizierung findet dabei auf der Basis eines Schwellenwerts in der exponentiellen Phase der PCR statt. Der Schwellenwert wird ebenfalls in der exponentiellen Phase der PCR bestimmt und dient der Generierung einer Waagerechten, welche zum Schnittpunkt (Ct-Wert) mit der jeweiligen PCR-Kurve jeder gemessenen Probe führt. Der Ct-Wert kann mittels einer Standardkurve umgerechnet werden, welche sich aus Proben definierter Nucleinsäuremengen zusammensetzt. Schließlich können so die Mengen der gemessenen Proben ermittelt werden. Am Ende jedes *Realtime*-PCR-Laufs wird anhand einer Schmelzkurve die spezifische Amplifikation des gewünschten Fragments detektiert. Hierbei wird die Schmelztemperatur des Fragments über schrittweise Erhöhung der Temperatur und gleichzeitiger Fluoreszenzmessung ermittelt. SYBR-Green fluoresziert nur, wenn es an doppelsträngige DNA gebunden ist, so dass bei vollständigem Vorliegen von einzelsträngiger DNA keine Fluoreszenz mehr erfasst werden kann. Diese Schmelztemperatur ist auf Grund der individuellen Basenkomposition eines Fragments sehr spezifisch.

In der vorliegenden Arbeit diente die *Realtime*-PCR der Detektion und der Quantifizierung von Transkripten. Hierzu wurde die cDNA-Synthese – wie beschrieben (2.7.13) – durchgeführt, nachdem die RNA-Proben mit dem „TECAN Safire^2“ quantifiziert worden waren. Bei einigen Messungen wurde die RNA-Konzentration mit einem Photometer bestimmt und die gemessene Menge eines Transkriptes gegen den Standard eines Haushaltsgens wie *Hmbs* (***h****ydroxy****me****thyl-****b****ilane* ***s****ynthase*) normalisiert.

Vor der Messung mittels des „LightCyclers® 1.5“ wurden die cDNA-Proben mit TE^{-4} (1:4 bei 150 ng RNA für die cDNA-Synthese) verdünnt. Von jeder cDNA-Probe wurden zwei unabhängige Verdünnungen gemessen und beide Werte für die Auswertung gemittelt. Bei starken Meßwertabweichungen zwischen zwei Verdünnungen einer Probe wurde die Messung wiederholt. Für jedes amplifizierte Transkript wurde eine Standardkurve mit cDNA etabliert, welche wie die zu messenden Proben präpariert worden war. Die Reaktionen wurden in

„LightCycler® Kapillaren“ gemessen. Ein allgemeines Pipettierschema und Bedingungen für eine *Realtime*-PCR sind im Folgenden gezeigt. Die verwendeten Primer und Bedingungen für *Realtime*-PCRs im Rahmen dieser Arbeit zeigt Tabelle 2.2.

Ansatz einer *Realtime*-PCR:
3 µl cDNA verdünnt (für mΔ7 4,5 µl)
1 µl Primer fw (10 pmol)
1 µl Primer rev (10 pmol)
1,2 µl $MgCl_2$ (4 mM)
0,833 µl SYBR Green I Reaktions-Mix
0,166 µl Polymerase
2,8 µl *Aqua dest*. (1,3 µl für mΔ7)

Allgemeine Bedingungen der *Realtime*-PCRs:
10 min Hitzedenaturierung bei 95°C
10 sek/95°C
15 sek/x°C
x sek/72°C
1 sek/78°C
} 38-44 Zyklen
15 sek/95°C
15 sek/65°C
} Schmelzkurve
30 sek/40°C

Tabelle 2.2: Für die *Realtime*-PCR verwendete Primer und Bedingungen

Transkript	***Sfrs10***	***FLmSmn***	***mSmnΔ7***	***SFRS10***	***Hmbs***	***Hb9***	***Islet1/2***
Primer	3218/3219	3434/3435	3439/3440	2836/2841	2196/2197	2887/2888	3603/3604
Primeranlagerung	63°C	68°C	65°C	63°C	65°C	66°C	66°C
Synthese/72°C	12 sek	4 sek	12 sek	12 sek	12 sek	12 sek	12 sek
Zyklen	44	38	40	44	41	38	38

2.8 Methoden zur Proteinanalyse

Zur Proteaseinhibition wurden Proteinproben stets auf Eis bzw. bei 4°C aufbereitet und bei -80°C gelagert.

2.8.1 Proteingewinnung aus Gewebe

Die Gewebe wurden zur Proteingewinnung mit 500 µl bis 1 ml RIPA-Lysispuffer (+Proteinase-Inhibitoren) bedeckt und mit einem „ULTRA-TURRAX®" homogenisiert. Das Homogenisat wurde 20 min auf Eis inkubiert, daraufhin 20 min bei 4°C und 12.000 rpm in einer Tischzentrifuge sedimentiert und der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt.

2.8.2 Proteingewinnung aus Zellen

Nach Abnahme des Kulturmediums wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Die PBS-Reste wurden sorgfältig entfernt und die Zellen mit RIPA-Puffer über 20 min auf Eis inkubiert. Hierbei wurden pro 6-*well* 30 µl und für eine 10 cm Petrischale 50 µl Puffer verwendet. Daraufhin wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers vom Boden der Kulturschale gelöst, in ein Reaktionsgefäß überführt und weitere 20 min auf Eis inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt über 20 min bei 4°C und 12.000 rpm wurde der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt.

2.8.3 Quantifizierung von Proteinen

Die Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch mittels des Bradford-Verfahrens (Bradford 1976). Die Methode beruht auf der Anlagerung von Coomassie Brilliant Blue an positiv geladene Aminosäuren, womit es zu einer Änderung des Absorptionsmaximums kommt. Unter der Annahme, dass positiv geladene Aminosäuren – statistisch gesehen – in gleicher Verteilung vorkommen, lässt sich so die Proteinkonzentration einer Lösung bestimmen. Dies geschieht anhand einer etablierten und im Photometer gespeicherten Eichreihe, welche aus Proteinwerten bekannter Konzentration besteht (Referenzwerte: 0,25 µg BSA-5 µg BSA).
Zur Konzentrationsbestimmung nach Bradford wurden je 2 µl der Proteinlösung mit 500 µl Bradford-Reagenz über 20 min bei RT inkubiert und darauf gegen einen Leerwert (RIPA + Bradford-Reagenz) bei 595 nm gemessen.

2.8.4 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei diesem Verfahren werden Proteine in einer Gelmatrix (Polyacrylamid) elektrophoretisch nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt (Laemmli 1970). Da Proteine wegen ihrer Aminosäurezusammensetzung und des umgebenden pH-Wertes stark in ihrer Ladung variieren, wird hierbei das negativ geladene Detergenz SDS verwendet. Dieses lagert sich an denaturierte Proteine, so dass ihr Laufverhalten im elektrischen Feld annähernd gleich ist und nur noch von ihrem Molekulargewicht beeinflusst wird. Hierbei dient die Gelmatrix als Molekularsieb, welches wegen seiner Porengröße das Wanderungsverhalten verschieden großer denaturierter Proteine im elektrischen Feld unterschiedlich beeinflusst. Das SDS-PAA-Gel besteht aus zwei Phasen: dem Sammel- und dem Trenngel. Ersteres dient zur Fokussierung der Proteingemischlauffront auf eine scharfe Bande. Mit der relativ niedrigen PAA-Konzentration von 5% und dem pH-Wert von 6,8 im Gel wandern alle Proteine einer Suspension nahezu gleich schnell im elektrischen Feld. Wegen des pH-Werts von 8,8 des Trenngels wird der Sammeleffekt an der Gelphasengrenze aufgehoben, so dass die Proteine nun nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Das Wanderungsverhalten der Proteine ist hierbei umgekehrt proportional zum Logarithmus ihres Molekulargewichts.

Die Proteingele wurden in entsprechenden Gelkammern präpariert, wobei zunächst das Trenngel ~2/3 (10-12%ig) der gesamten Glasplattenlänge hoch gegossen und bis zur Polymerisierung mit 70%igem EtOH überschichtet wurde. Nach sorgfältiger Entfernung des Alkohols wurde nun das Sammelgel unter Aussparung von Geltaschen zum Einbringen der Proteinproben aufgeschichtet. Diese wurden vor der Elektrophorese mit je 5 µl 2x Laemmli-Probenpuffer (+1/10 Vol. ME) versehen, 5 min bei 95°C denaturiert, 5 min auf Eis abgekühlt und schließlich neben einem Größenstandard aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte zunächst über 1-2 h bei 50 V bis die Lauffront ins Trenngel übergegangen war. Daraufhin wurde die Spannung auf 70-100 V erhöht und belassen, bis die gewünschte Fragmentgröße des Standards den unteren Teil des Trenngels erreicht hatte.

Zur Analyse von Proteinen aus Zellen wurden 6 µg und zur Analyse von Gewebsproteinen 5-7,5 µg verwendet.

2.8.5 *Western Blot*-Analysen

2.8.5.1 *Western Blot* – Transfer von Proteinen auf eine Membran

Diese Methode dient dem Transfer von elektrophoretisch aufgetrennten Proteinen vom Gel auf eine Nitrozellulose- oder Nylon-Membran. Zur Anwendung dieser Methode wurde das Sammelgel vom Trenngel separiert. Der Blot wurde nun in einem speziellen *Blotting*-Träger luftblasenfrei aufgeschichtet, wobei alle Komponenten zuvor in Transferpuffer äquilibriert wurden. Ausgehend von der Kathode wurde zunächst ein Schaumstoffkissen, gefolgt von einem Filterpapier in Gelgröße aufgebracht, auf welches wiederum das Trenngel gelegt wurde. Die Nitrozellulosemembran in Gelgröße wurde direkt auf das Gel gebracht und der Aufbau mit einem Filterpapier und einem Schaumstoffkissen abgeschlossen. Der Proteintransfer erfolgte über Nacht bei 30 V und 4°C. Der Nachweis transferierter Proteine auf solchen Membranen erfolgte mit immunologischen Methoden (2.8.5.2)

2.8.5.2 Immunologischer Nachweis von Proteinen auf einer Membran

Unter der Verwendung primärer und sekundärer Antikörper können auf einer Membran spezifische Proteine detektiert werden. Nach Abbau des *Western Blots* wurden hierzu zunächst unspezifische Bindestellen 2 h bei 4°C unter Inkubation mit 6%igem Milchpulver/TBS-Tween auf einem Schüttelinkubator geblockt. Hierauf erfolgte die 1-16stündige Inkubation mit dem primären Antikörper in 2%igen Milchpulver/TBS-Tween. Nach 5maligem Waschen (je 5 min) mit TBS-Tween wurde die Membran mit dem sekundären Peroxidase-gekoppelten Antikörper ebenfalls in 2%iger Milchpulverlösung inkubiert. Nach einem weiteren Waschschritt (5 mal 5 min, TBS-Tween) wurde die Membran 5 min mit der Chemilumineszenz-Lösung versetzt. Das in der Lösung enthaltene Luminol wird von der – an den sekundären Antikörper gekoppelten – Peroxidase gespalten und führt somit zu einer Fluoreszenzreaktion. Diese wurden über Autoradiographien erfasst, wobei Röntgenfilme unterschiedlich lange exponiert wurden. Die Proteinbanden wurden nach Entwicklung des Filmes an einem Dokumentationsgerät mit Hilfe einer speziellen Software densitometrisch quantifiziert. Zur Auswertung wurde ein Kontrollprotein gewählt, welches ebenfalls auf jedem zu quantifizierenden Gel angefärbt wurde. Hierbei wird üblicherweise das Protein eines Haushaltsgens – wie z.B. β-Aktin – verwendet. Dieses dient dann dem Vergleich der Proteingesamtmenge verschiedener Proben und sollte für diese annähernd gleich sein.

Sollte ein *Blot* mit einem anderen Antikörper rehybridisiert werden, so wurde die Membran zuvor sieben Minuten mit „Restore *Western Blot* Stripping Buffer“ auf einem Schüttelinkubator

inkubiert. Mittels erneuter Behandlung mit der Chemilumineszenz und der Exposition eines Röntgenfilms wurde überprüft, ob der Antikörper vollständig entfernt worden war.
Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper sowie deren eingesetzte Verdünnungen und Inkubationszeiten sind Tabelle 2.6.3 zu entnehmen.

2.8.6 Immunhistologische Färbungen von Paraffinschnitten mittels Peroxidasereaktion

Zur Präparation von Paraffinschnitten wurden Organe bzw. Embryonen in 4% PFA über Nacht bei 4°C fixiert und mittels eines Gewebeinfiltrationsautomaten (Leica TP1020) eingebettet. Sollten Rückenmarkschnitte angefertigt werden, wurde die komplette Wirbelsäule vor dem Einbetten entnommen und nach der Fixierung in PFA fünf Tage in 4 M Ameisensäure bei 4°C und täglichem Wechsel der Säure dekalzifiziert.
Die Paraffinschnitte (7 µm) wurden an einem Mikrotom (Leica RM2255) in der Genetik der Universität zu Köln gefertigt. Die immunhistologischen Analysen wurden größtenteils in den Laboratorien der AG Prof. Dr. Schröder der Anatomie der Universität zu Köln durchgeführt.
Vor der Immunreaktion mit den entsprechenden Antikörpern wurden die Präparate über zweimalige, je einstündige Inkubation in Xylol (I. und II.) entparaffiniert. Mit Behandlung in einer absteigenden Alkoholreihe (100% EtOH II/1 min; 100% EtOH I/1 min; 96% EtOH/1 min; 70% EtOH /1 min; *Aqua dest.*/10 min) wurden die Schnitte daraufhin rehydriert, um eine bessere Zugänglichkeit für die Antikörper zu gewährleisten. Die Schnitte wurden in einer weiteren Vorbehandlung in Citratpuffer dreimal über je 5 min bei 600 W in einer Mikrowelle aufgekocht und schließlich etwa 45 min auf Raumtemperatur abgekühlt. Nach einmaligem 5minütigen Waschen mit TBS wurden die Präparate zur Vermeidung unspezifischer Bindungen 45 min bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer mit der Blocklösung inkubiert, welche direkt auf die einzelnen Schnitte pipettiert wurde. Nach dreimaligem Waschen über je 5 min mit TBS wurden die Präparate ü.N. bei 4°C in einer feuchten Kammer mit dem primären Antikörper inkubiert, welcher in einer 3%igen Milchpulver-TBS-Lösung verdünnt worden war. Stets wurde pro Objektträger eine Negativkontrolle eingeschlossen, in welcher reine Milchpulverlösung ohne Antikörper verwendet wurde.
Nach dreimaligem Waschen (à 5 min) mit TBS wurden die Präparate 30 min bei Raumtemperatur mit einem biotinylierten sekundären Antikörper inkubiert (in 3%igem TBS-Milchpulver), daraufhin wiederum dreimal mit TBS gewaschen und schließlich für 30 min bei RT in einer feuchten Kammer mit dem „Avidin-biotinylierte-Peroxidase-Komplex“ (ABC-Kit) inkubiert. Je ein Tropfen der beiden Komponenten des Kits wurden 30 min vor der Anwendung in 5 ml TBS gemischt und 30 min bei Raumtemperatur auf einem Schüttelinkubator belassen.

Die Objektträger wurden erneut dreimal je 5 min mit TBS gewaschen, wonach die Farblösung direkt auf die Präparate aufgebracht wurde. Die Farbreaktion wurde unter dem Mikroskop verfolgt und abhängig von ihrer Stärke nach 3-10 min mit TBS abgestoppt.
Bei dieser Methode bindet Peroxidase-gekoppeltes Streptavidin (Bestandteile des ABC-Kits) sehr spezifisch und irreversibel den biotinylierten sekundären Antikörper. Mit der Verwendung von H_2O_2 und DAB in der Färbelösung kann diese Reaktion sichtbar gemacht werden. Die Peroxidase spaltet H_2O_2, wobei Protonen und H_2O frei werden. Die Protonen oxidieren das DAB, welches nunmehr eine bräunliche Färbung annimmt.
Zur (optionalen) Gegenfärbung von Zellkernen und Cytoplasma wurden die Schnitte mit GIEMSA (Zellkerne blau, Cytoplasma rot) inkubiert. Die Lösung wurde wiederum direkt auf die Präparate gebracht und 7 min bei RT inkubiert.
Im unmittelbaren Anschluss an die Färbungen wurden die Schnitte kurz in *Aqua dest.* und schließlich zur Dehydrierung in eine aufsteigende Alkoholreihe gebracht. Hierbei wurden die Objektträger jeweils nur kurz zum Auswaschen der Farbwolken in die einzelnen Alkoholschritte der Reihe getaucht (96 % EtOH, zur Vermeidung des völligen Auswaschens ist direkt in 100% EtOH zu beginnen; 100 % EtOH I, 100 % EtOH II) und schließlich zweimal in Xylol (Xylol I./II.) für 5 min inkubiert. Die Schnitte wurden nach Entnahme aus dem Xylol sogleich mit DPX eingedeckt und somit dauerhaft konserviert.

2.8.7 Immunfluoreszenz Färbungen von Paraffinschnitten

Die Färbung von Proteinen bei dieser Methode beruht auf der Kopplung der sekundären Antikörper mit Fluoreszenzfarbstoffen, welche dann unter Verwendung von UV-Licht und einem entsprechenden Filter am Mikroskop sichtbar gemacht werden können. Sobald die Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten sekundären Antikörper ihre Verwendung fanden, wurde stets unter Lichtausschluss gearbeitet, da die empfindlichen Farbstoffe im Licht an Reaktivität verlieren.
Die Aufbereitung von Paraffinschnitten für Immunfluoreszenzfärbungen erfolgte wie unter 2.8.6 beschrieben. Nach der Inkubation des ersten Antikörpers erfolgte ein Waschschritt (3 mal 5 min mit TBS) und die Inkubation mit dem Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten sekundären Antikörper. Nach einem weiteren Waschschritt wurden die Zellkerne (optional) mit „Hoechst 33342 Dye" gegengefärbt oder direkt mit *Mounting*-Medium eingedeckt. Nach der Gegenfärbung wurden die Schnitte erneut gewaschen und wiederum eingedeckt.

2.8.8 LacZ-Färbung von Geweben und Maus-Embryonen

Die zu analysierenden Gewebe oder Embryonen wurden in PBS + $MgCl_2$ präpariert, 10 min bei RT in 0,1 M PO_4 Puffer pH 7,3 inkubiert und daraufhin je nach Organ-/Embryogröße über 30-90 min bei RT in je 2 ml Fixierlösung inkubiert. Die Präparate wurden daraufhin dreimal 30 min gewaschen und schließlich mit je 2,5 ml X-Gal-Färbelösung über Nacht bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die blaue Färbung war nach dieser Zeit mit bloßem Auge erkennbar. Die Präparate wurden daraufhin in PBS gelagert oder in Paraffin eingebettet und für weitere mikroskopische Analysen geschnitten.

2.8.9 Nissl-Färbung von Rückenmarkschnitten

Die Methode diente der Generierung von Übersichtsfärbungen von Rückenmarkschnitten. Der Farbstoff Kresylviolett bindet RNA und DNA, so dass Ribosomen und Nucleoli blau-violett angefärbt werden. Charakteristisch für Färbungen von Nervengewebe sind die sogenannten „Nissl-Schollen", welche dem rauen endoplasmatischen Retikulum entsprechen. Mit dieser Methode lassen sich gesunde von geschädigten Neuronen differenzieren.

Die Schnitte wurden nach der Deparaffinierung (2.8.6) 2 min in H_20 gebracht und daraufhin 30 min mit der Kresylviolett-Acetatlösung inkubiert. Die Färbelösung wurde mit Hilfe zweimaligen Spülens mit H_20 entfernt, worauf die Schnitte eine Minute in 96%igem EtOH und eine Minute in 100%igem EtOH inkubiert wurden. Nach 2-5minütiger Inkubation in Xylol wurden die Schnitte schließlich eingedeckt.

2.9 Zellbiologische Methoden

Die Kultivierung von Zellen wurde in den Zell-Kultur-Laboratorien der AG Prof. Dr. Brüning des Instituts für Genetik, Köln, durchgeführt. Die Zellen wurden in Inkubatoren bei 37°C in einer feuchten Atmosphäre und bei einer konstanten CO_2-Konzentration von 10% gehalten.
Alle steril zu verrichtenden Arbeiten wurden an einer Sterilbank durchgeführt. Medien und Lösungen wurden in sterilen Flaschen mit sterilen Glas- oder Plastikpipetten angesetzt und zusätzlich, falls erforderlich, steril filtriert. Materialien und Geräte wurden vor jeder Benutzung mit 70%igem Ethanol oder „Bacillol®" gesäubert. Vor Arbeitsbeginn wurden Hände und Arme gründlich gewaschen und zusätzlich mit „Sterillium®" desinfiziert. Während aller Arbeitsschritte wurden Handschuhe getragen. Verwendete Glaspipetten wurden sowohl autoklaviert als auch vor dem unmittelbaren Gebrauch abgeflämmt. Die beschriebenen Techniken wurden nach Torres and Kühn (Torres R. and R. 1997) modifiziert.

2.9.1 Zellkultivierung

Alle Zelltypen wurden täglich unter einem inversen Phasenkontrastmikroskop kontrolliert. Die embryonalen Fibroblasten-(EF)Zelllinien wurden bei Erreichen der Konfluenz passagiert. ES-Zellen wurden nur bis zur Subkonfluenz gehalten, um eine Differenzierung der Kolonien zu vermeiden. Vor dem Passagieren wurden die Zellen stets mit PBS gewaschen und darauf mit 1x Trypsin/EDTA bei 37°C über 3-5 min trypsinisiert. Die Reaktion wurde mit demselben Volumen des entsprechenden Zellmediums abgestoppt. Die Zellsuspension wurde mit einer Pipette von der Petrischale gespült, in ein konisches Röhrchen überführt und 5 min bei 1200 rpm und 4°C zentrifugiert. Nach Entnahme des Überstands wurden die Zellen in dem entsprechenden Medium resuspendiert und auf frische Petrischalen gebracht.

2.9.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren wurden die Zellen zunächst – wie beschrieben (2.9.1) – geerntet, nach Zentrifugation in steril filtriertem Einfriermedium resuspendiert, auf Eis in kryogenischen Röhrchen aliquotiert und langsam bei -80°C eingefroren. Zur Langzeitaufbewahrung wurden die Zellen 24-72 h später in einen Tank mit flüssigem Stickstoff überführt (Ure et al. 1992). Bei Bedarf wurden die Zellen auch auf 96-*well*-Platten eingefroren. Dazu wurden die Einzelzellsuspensionen in Einfriermedium mit einer finalen DMSO-Konzentration von 10% gemischt und die Platten langsam bei -80°C eingefroren.

Eingefrorene Zellen wurden in einem Wasserbad bei 37°C aufgetaut und zügig in 10 ml Medium überführt, um die toxischen Effekte des DMSO zu kompensieren. Die Zellsuspension wurde bei 1.200 rpm 5 min lang zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in dem adäquaten Medium resuspendiert und auf eine entsprechenden Anzahl von Petrischalen ausplattiert. Eingefrorene 96-w*ell*-Mikrotiterplatten wurden in einer Plastikhülle vorsichtig in einem Wasserbad (37°C) geschwenkt. Die Zellsuspension wurde mit Hilfe einer Pasteurpipette sofort in ein MMC-EF-beschichtetes (2.9.4.2) 24-*well* überführt, welches vollständig mit frischem Medium aufgefüllt wurde, um die Toxizität des DMSO zu kompensieren.

2.9.3 Bestimmung der Anzahl von Zellen

Die Zellanzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Zu diesem Zweck wurden 10 µl einer Zellsuspension unter das Deckgläschen einer Zählkammer pipettiert. Um lebende von toten Zellen unterscheiden zu können, wurde die Suspension zuvor im Verhältnis 1:1 mit Trypan-Blau gemischt. Trypan-Blau gelangt über die poröse Zellmembran toter Zellen und färbt diese blau. Nur lebende Zellen wurden in den Zählungen berücksichtigt. Es wurden jeweils vier von neun großen Quadranten der Kammer mit einem jeweiligen Fassungsvolumen von 0,1 µl gezählt. Um die Zellanzahl pro Milliliter Suspension zu bestimmen, wurde die durchschnittliche Zellzahl pro Quadrant mit 10^4 multipliziert. Die Gesamtanzahl an Zellen wurde unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors und des Gesamtvolumens kalkuliert.

2.9.4 Murine embryonale Fibroblasten (MEFs)

Da die Pluripotenz von embryonalen Stammzellen entscheidend für deren weitere Verwendung ist, müssen diese unter Konditionen gehalten werden, die eine Differenzierung – wie die Ausbildung embryonaler Strukturen z.B. von Endoderm und Ektoderm – vermeiden. Aus diesem Grund wurden ES-Zellen auf mitotisch-inaktivierten embryonalen Fibroblasten kultiviert. Ferner wurde dem Medium *myeloid leukemia inhibitory facto*r (LIF) zugefügt (Evans and Bozdech 1981; Smith et al. 1988; Williams et al. 1988).

2.9.4.1 Präparation embryonaler Fibroblasten

Primäre EF-Zellen wurden aus murinen Embryonen an Tag E13.5 gewonnen. Die Mäuse der benötigten Genotypen wurden verpaart. Eine Schwangerschaft wurde anhand der Existenz von Vaginalpfropfen geprüft (siehe auch 2.10.5). Solche *plug*-positiv-getesteten Weibchen wurden 13 Tage später getötet, die Embryonen unter sterilen Konditionen dem Uterus entnommen und

mit PBS gewaschen. Für die Transfektionsexperimente in embryonalen Stammzellen wurden neomycinresistente EF-Zellen benötigt. Zur Gewinnung dieser Zellen wurde eine Neomycin-resistente männliche Maus der transgenen Mauslinie IL-4 (Muller et al. 1991) mit weiblichen C57BL/6-Mäusen verpaart. Für die Gewinnung der MEFs wurde den isolierten Embryonen Leber, Herz und Kopf entfernt und das verbleibende Gewebe in eine mit PBS gefüllte Petrischale transferiert. Das Gewebe wurde mit 50 ml Trypsin/EDTA 30 min bei 37°C inkubiert, die Reaktion anschließend mit EF-Medium abgestoppt, die Zellen mittels Zentrifugation sedimentiert und schließlich in EF-Medium resuspendiert. Die Zellanzahl wurde mit Hilfe einer Zählkammer bestimmt. Jeweils $2{,}5 \times 10^6$ Zellen wurden auf einer 15 cm Kulturgewebeschale ausplattiert. Die Zellen wurden bis zur Konfluenz gehalten und schließlich, wie beschrieben, in Aliquots von etwa 5×10^6 Zellen eingefroren. Für die ES-Zellkultur wurden drei Generationen von EF-Zellen benutzt (EF1, EF2 und EF3). Für Transfektionsexperimente wurden nur EF1- oder EF2-Zellen verwendet.

Zur Gewinnung homozygot-gefloxter *Sfrs10*-Fibroblasten wurden zwei Tiere verpaart, welche das *Sfrs10*-Gen homozygot-gefloxt trugen. Für die Gewinnung und Etablierung von Fibroblasten aus solchen homozygot-gefloxten Embryonen wurden diese, wie beschrieben, dem Uterus entnommen und mit PBS gewaschen. Auch Kopf, Herz und Leber wurden entfernt, wobei der Kopf zur Gewinnung von DNA zur Genotypisierung verwendet wurde. Die Embryonen wurden dann einzeln weiterverarbeitet und nicht wie für EF-Zellen, welche als ES-Zell-Schichten verwendet wurden, gemischt. Jeder Embryo wurde mit der Kolbenrückseite einer 10 ml Spritze durch ein Zellsieb homogenisiert. Das Sieb wurde gründlich mit 10 ml EF-Medium (mit Pen/Strep) gespült und der Durchfluss in einem 50 ml Reaktionsgefäß aufgefangen. Nach 5minütiger Sedimentation des Lysats bei 1200 rpm wurde der Überstand verworfen, das zellhaltige Pellet in 6 ml EF-Medium resuspendiert und jeweils auf einer gelatinisierten 6 cm Petrischale ausplattiert. Nachdem sich die EF-Zellen am Boden der Platte abgesetzt hatten, wurde am nächsten Tag das Medium gewechselt, um verbliebene Zelltrümmer zu entfernen. Die Zellen wurden bei täglichem Mediumwechsel expandiert bis eine adäquate Anzahl archiviert worden war.

2.9.4.2 Mitomycin C-Behandlung

ES-Zellen wurden zur Vermeidung der Zelldifferenzierung auf einer Schicht mitotisch inaktivierter EF-Zellen kultiviert. Zu diesem Zweck wurden EF-Zellen mit Mitomycin C (MMC) behandelt. Das MMC wurde zur Behandlung der Zellen in EF-Medium gelöst und steril filtriert (Endkonzentration: 10 µg/ml). Die EF-Zellen wurden, nach Abnehmen des Mediums, 2-5 h mit

dem Mitoseinhibitor behandelt. Daraufhin wurden die Zellen dreimal gründlich mit PBS gewaschen, um jegliche MMC-Reste zu entfernen, und schließlich trypsinisiert, zentrifugiert und resuspendiert. Die Einzelzellsuspension wurde in EF- oder ES-Medium auf die entsprechenden Petrischalen gebracht. Diese wurden vor Benutzung stets gelatinisiert. Die Kulturplatten wurden hierzu mit 0,2 %iger Gelatinelösung bedeckt und 3 min bei 37 °C inkubiert. Nach Verwerfen des Gelatineüberstandes wurden die zuvor MMC-behandelten EF-Zellen auf den beschichteten Platten gleichmäßig verteilt. Nach dem erneuten Ausplattieren wurden die EF-Zellen zunächst mindestens 2-4 h inkubiert, bevor darauf ES-Zellen plattiert wurden. Um eine ideale Wachstumsschicht für die ES-Zellen (2.9.5) zu bieten, musste der Boden der Kulturschale vollständig mit EF-Zellen bedeckt sein, so dass die zu verwendende Zellzahl stets angepasst wurde.

2.9.5 Murine embryonale Stammzellen (ES-Zellen)

ES-Zellen stammen aus der inneren Zellmasse eines frühen Mausembryos, der Blastocyste (3.5 dpc), und können *in vitro* kultiviert werden (Evans and Kaufman 1981; Martin 1981). Diese Zellen sind pluripotent, können sich also potentiell zu allen Zelltypen entwickeln. ES-Zellen können mit molekularbiologischen Methoden *in vitro* genetisch manipuliert werden (Gossler et al. 1986; Robertson et al. 1986) und darauf in Blastocysten reinjiziert werden. Diese Blastocysten, deren Zellmasse dann sowohl aus eigenen als auch aus manipulierten injizierten Zellen besteht, werden dann in scheinschwangere Empfängerweibchen transferiert. Die manipulierten ES-Zellen können an der Embryoformation teilhaben, wodurch chimäre Mäuse generiert werden (Bradley et al. 1984; Gossler et al. 1986; Robertson et al. 1986). Diese bestehen sowohl aus wildtypischen als auch aus manipulierten Zellen. Die chimären Mäuse können je nach Stamm der verwendeten ES-Zellen und Blastocysten ein mischfarbiges Fell aufweisen. Der Grad an Chimärismus wird als Indikator für den Grad an rekombinanten ES-Zellen gewertet, die zur Embryogenese beigetragen haben. Ziel der Versuche ist eine Keimbahntransmission der rekombinanten Zellen, so dass deren Genotyp weitervererbt wird und schließlich jede Zelle eines Nachkommens der Chimären – zunächst im heterozygoten Zustand – die genetische Modifikation trägt (Schwartzberg et al. 1989; Zijlstra et al. 1989). Um eine hohe Chimärismusrate zu erzielen und somit die Wahrscheinlichkeit einer Keimbahntransmission zu erhöhen, muss mittels entsprechender Kulturbedingungen gewährleistet sein, dass die ES-Zellen ihren undifferenzierten Status behalten (Smith 1992). Dieser Zustand wird über die Kultivierung der ES-Zellen auf mitotisch-arretierten murinen EF-Zellen und über den Zusatz des Cytokins LIF (***l****eukemia* ***i****nhibitory* ***f****actor*) zum ES-Zell-Kulturmedium (Smith et al. 1988) gewährleistet.

ES-Zellen wachsen in Kolonien mit einer definierten Form und müssen täglich unter dem Stereomikroskop kontrolliert werden, um einer Zelldifferenzierung vorbeugen zu können, die auch mit hoher Konfluenz der Zellen induziert wird. Die Kolonien müssen auf neue EF-Zell-beschichtete Platten passagiert werden, bevor sie ihre scharfen Grenzen verlieren und anfangen sich zu berühren. Der Erfolg einer Keimbahntransmission ist stark von der Qualität der Zellkultur abhängig. Der Grad an Chimärismus, den ein Tier erreichen kann, hängt entscheidend von den verwendeten ES-Zellen und den Blastocysten ab. Hierbei sollte eine höhere Teilungsgeschwindigkeit auf Seiten der verwendeten ES-Zellen liegen, so dass die injizierten ES-Zellen maßgeblich zur Entwicklung des Tieres beitragen können.
In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl C57BL/6-ES-Zellen (Bruce4) (Kontgen et al. 1993) als auch V6.5-ES-Zellen (Eggan et al. 2002) verwendet.
Die Kultivierung von ES-Zellen erfolgte auf gelatinisierten und MMC-behandelten, EF-Zell-beschichteten Petrischalen (Evans and Bozdech 1981).

2.9.5.1 Transfektion von ES-Zellen

Bei einer Transfektion kann über verschiedene molekularbiologische Methoden die Aufnahme von DNA in eukaryotische Zellen herbeigeführt werden. Zur Transfektion von ES-Zellen wird üblicherweise die Elektroporation (Neumann et al. 1982; Potter et al. 1984) verwendet, wobei die Zellen zu diesem Zeitpunkt etwa 50-70% konfluent sein sollten.
Das *targeting*-Konstrukt pRF-*Sfrs10* wurde mittels Inkubation über Nacht im Wasserbad bei 37°C mit der Restriktionsendonuclease Not I linearisiert. Zur Entfernung von Proteinen wurde im Anschluss eine Phenol-Chloroform-Extraktion (2.7.3.3) durchgeführt und die DNA in drei Volumina 100%igem EtOH und 1/10 Vol. Natriumacetat über Nacht bei -20°C präzipitiert. Um sterile Bedingungen zu gewährleisten, wurde die DNA dann in 70%igem Ethanol gelagert. Es wurden 40-50 µg DNA verwendet, um $1x10^7$ ES-Zellen zu transfizieren. Die ES-Zellen wurden vier bis fünf Tage vor der Transfektion aufgetaut und zwei Tage später passagiert. Vier Stunden vor der Transfektion wurde das ES-Medium ausgetauscht, um eine optimale Versorgung der Zellen mit Nährstoffen zu gewährleisten. Unmittelbar vor der Transfektion wurden die Zellen mit je 3 ml Trypsin pro 10 cm Schale behandelt und die Reaktion wurde mit je 7 ml ES-Medium pro 10 cm Platte abgestoppt. Die Zellzahl wurde bestimmt; schließlich wurden $1x10^7$ Zellen sedimentiert und in 400 µl Transfektionspuffer resuspendiert. Der linearisierte *targeting*-Vektor wurde nach Zentrifugation in 400 µl Transfektionspuffer aufgenommen und zu den Zellen gegeben. Die Mixtur wurde in eine auf Eis gekühlte Elektroporationsküvette überführt. Die Elektroporation wurde mit einem Elektroporator bei 240 V und 500 µF durchgeführt. Im An-

schluss wurden die Zellen 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, in ES-Medium aufgenommen und auf sechs MMC-EF-Zell-beschichtete 10 cm Petrischalen ausplattiert. Jeder Transfektionsansatz wurde in doppelter Ausführung vorgenommen.

2.9.5.2 Selektion positiv-transfizierter Klone in Kultur

Nach der Transfektion von ES-Zellen mit einem *targeting*-Konstrukt müssen Zellen, die den linearisierten Vektor aufgenommen bzw. in ihr Genom integriert haben, mit Hilfe eines positiven Selektionsmarkers angereichert werden. Der verwendete *targeting*-Vektor enthielt das *Neomycin*-Resistenzgen, wodurch Zellen, die das Konstrukt stabil in ihr Genom integriert hatten, selektiert werden konnten. Die positive Selektion wurde mit dem Neomycin-Analogon G418 zwei Tage nach der Transfektion begonnen, indem die Zellen mit Medium gefüttert wurden, welchem G418 (225 µg/ml aktive Konzentration) zugesetzt wurde. Die Zellen wurden ab diesem Zeitpunkt unter G418-Selektion gehalten.
Da das *targeting*-Konstrukt sowohl zufällig als auch homolog in das Genom integriert werden kann, beinhaltet ein *targeting*-Konstrukt oft zusätzlich einen negativen Selektionsmarker am 3'-Ende. Dieser Selektionsmarker geht bei einer homologen Rekombination verloren, wohingegen er bei zufälligen Integrationen für gewöhnlich erhalten bleibt (Folger et al. 1982). Der verwendete *targeting*-Vektor enthielt als negativen Selektionsmarker das *Thymidinkinase*-Gen des *Herpes simplex*-Virus. Unter einer negativen Selektion wird dem ES-Medium die Substanz Ganciclovir (Ganc) zugesetzt. Wird die Thymidinkinase exprimiert, so phosphoryliert diese Ganc zu Ganc-Monophosphat, welches über zelluläre Enzyme weiter zu Ganc-Triphosphat phosphoryliert wird. Ganc-Triphosphat wird während der Replikation in die synthetisierende DNA eingebaut, was letztlich zum Zelltod führt. Aus diesem Grund können mit Ganc-Behandlung Klone, die zufällige Integrationen tragen selektiert werden, wohingegen homologe Rekombinanten mit der Substanz nicht beeinträchtigt werden, da sie das *HSV-TK*-Gen nicht mehr tragen. Ab dem fünften Tag nach der Transfektion wurde dem G418-haltigen ES-Medium die negative Selektionssubstanz Ganciclovir (finale Konzentration 2 µM) zugesetzt. Dieses Selektivum wurde – wie auch die Selektion mit Neomycin – bis zur Isolierung der Klone (2.9.5.3) beibehalten.

2.9.5.3 Isolierung von ES-Zellklonen

Zwischen dem achten bis zehnten Tag nach der Transfektion waren die nach den Selektionsschritten überlebenden Klone als runde Kolonien sichtbar, so dass sie unter sterilen Beding-

ungen auf 96-*well*-Titerplatten isoliert und für weitere Analysen expandiert werden konnten. Dazu wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und schließlich mit PBS bedeckt. Die einzelnen Kolonien wurden unter semi-sterilen Bedingungen (geöffnete Sterilbank, Mundschutz, Haube) am Stereomikroskop mit einer Pipette in einem Volumen von 20 µl aufgenommen und auf eine 96-*well*-Titerplatte mit rundem Boden gebracht. Jeder isolierte Klon wurde in eine Vertiefung mit 50 µl Trypsin überführt. Nach 20-30 Minuten wurde die jeweilige Kulturplatte 3-5 min bei 37°C inkubiert. Die Trypsinisierung wurde im Anschluss über die Zugabe von 80 µl ES-Medium gestoppt und die Zellen mittels Pipettieren vereinzelt. Schließlich wurden die 150 µl Zellsuspension jeder Vertiefung auf drei gelatinisierte und MMC-EF-Zell-beschichtete Vertiefungen dreier 96-*well*-Mikrotiterplatten mit flachem Boden verteilt, so dass jeder isolierte Klon als Triplikat vorhanden war. Die ES-Klone wurden 3-4 Tage unter täglichem Mediumwechsel expandiert. Zwei dieser Platten wurden dann in einem Abstand von 24 h als Reserve eingefroren. Zu diesem Zweck wurden die Klone jeweils zweimal mit 100 µl PBS gewaschen und mit 50 µl 1x Trypsin über 3 min bei 37°C inkubiert. Nach Abstoppen der Reaktion mit 100 µl ES-Medium wurden pro Klon 100 µl Einfriermedium hinzugefügt und die Platten nach dem Abdichten mit Parafilm bei -80 °C eingelagert. Diese Platten dienten der Archivierung potentiell positiver Klone. Die Klone auf der dritten dieser 96-*well*-Mikrotiterplatten – mit zu den eingefrorenen Platten identischen Klonen – wurden bis zur Konfluenz expandiert und nach dem Waschen und Trypsinisieren auf wiederum drei ausschließlich mit Gelatine beschichteten 96-*well*-Mikrotiterplatten („Flachboden") passagiert. Die Klone auf diesen Platten sollten der späteren DNA-Isolierung und weitergehenden Analyse dienen und wurden bis zur Vollkonfluenz expandiert. Das Medium wurde entnommen, die Klone je zweimal mit PBS gewaschen und zwei der Platten als Reserve ohne Einfriermedium nach Abdichtung mit Parafilm bei -20°C gelagert. Eine der Platten wurde direkt zur DNA-Isolation verwendet.

2.9.5.4 Analyse von ES-Zellen auf 96-*well*-Mikrotiterplatten

Die korrekte Integration des transfizierten DNA-Konstruktes wurde mittels *Southern Blot*-Analysen (2.7.10) ermittelt. Zur DNA-Gewinnung wurden die Klone direkt auf den 96-*well*-Mikrotiterplatten mit je 50 µl Lysispuffer/Proteinase K versetzt. Die Titerplatten wurden mit Parafilm abgedichtet, mit feuchten Tüchern umwickelt und in einer feuchten Kammer bei 55°C über Nacht. im Wasserbad inkubiert. Nach einstündiger Abkühlung der Platten auf Raumtemperatur wurde jeder Vertiefung der Platte 100 µl 100%iges Ethanol zugefügt und eine Stunde bei Raumtemperatur zur Präzipitation der DNA inkubiert. Daraufhin wurde der Überstand mit

vorsichtigem Invertieren der Platten entfernt, das verbleibende DNA-Pellet je dreimal mit 70%igem Ethanol gewaschen und 20-30 min bei 37°C im Inkubator getrocknet. Die gewonnene DNA wurde nun mit Restriktionsendonucleasen (2.7.9) fragmentiert. Pro Vertiefung der Platte wurden 35 µl Enzymansatz verwendet. Die Platten wurden wiederum mit Parafilm abgedichtet und in einer feuchten Kammer ü.N. bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Im Anschluss wurde die so fragmentierte DNA jedes Klons im Rahmen von *Southern*-Analysen untersucht (2.7.10).

2.9.5.5 Auftauen und Expandieren von Klonen auf 96-*well*-Mikrotiterplatten

Nachdem die ES-Zell-Klone in *Southern Blot*-Analysen als eindeutig positiv auf die homologe Rekombination des pRF-*Sfrs10* getestet worden waren, wurden sie von den archivierten 96-*well*-Mikrotiterplatten aufgetaut (2.9.5.3), auf je eine Vertiefung einer 24-*well*-Platte überführt und bis zur Subkonfluenz dort belassen. Die den homolg-rekombinanten Klonen benachbarten Klone wurden ebenfalls aufgetaut, um – wegen der zahlreichen Proben auf den *Southern*-Gelen – Verwechslungen zu vermeiden. Die Zellen wurden in je eine Vertiefung einer beschichteten 6-*well*-Platte passagiert, bis zur Subkonfluenz auf dieser gehalten, um die Zellen dann auf je zwei beschichtete (mit Gelatine und MMC-EF-Zellen) 10 cm Petrischalen sowie auf ein gelatinisiertes 24-*well* zu überführen. Die Zellen von den 10 cm Platten wurden bei Erreichen der Subkonfluenz zu je ¼ eingefroren (2.9.2). Die Zellen auf den 24-*well*-Mikrotiterplatten wurden bis zur Vollkonfluenz belassen und dienten der DNA-Isolation (2.7.3.2), um in entsprechenden Analysen die Ergebnisse der ersten *Southern Blots* zu verifizieren.

2.9.5.6 Präparation positiver ES-Zell-Klone für Blastocysten-Injektionen

Fünf Tage vor Injektion der ES-Zellen in Blastocysten wurden positiv getestete ES-Klone aufgetaut und auf gelatinisierte und MMC-EF-beschichtete 10 cm Petrischalen plattiert. Nach zwei bis drei Tagen wurden die Zellen je nach Klondichte in verschiedenen Verdünnungen auf 10 cm Platten passagiert. Am Tag der Injektion wurde jene Platte präpariert, auf welcher die Klone nicht zu dicht gewachsen waren und eine adäquate Größe und Form aufwiesen. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen, trypsinisiert, sedimentiert, in 10 ml ES-Medium resuspendiert, auf eine gelatinisierte 10 cm Schale plattiert und 30-40 min bei 37°C inkubiert. Während dieser Zeit hefteten sich die in der Suspension enthaltenen EF-Zellen an den Boden der Petrischale, während der Großteil ES-Zellen im Überstand verblieb. Es wurden verschiedene Fraktionen entnommen: Der ES-Zell-haltige Überstand wurde in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt (Fraktion 1). Die Petrischale wurde dann mit 10 ml ES-Medium gespült und die re-

sultierende Zellsuspension in ein zweites 15 ml Reaktionsgefäß überführt (Fraktion 2). Proben beider Fraktionen wurden unter dem Mikroskop auf Reinheitsgrad und Zellmenge geprüft. Die Fraktionen wurden schließlich sedimentiert, in je 500 µl vorgekühltem Injektionsmedium resuspendiert und bis zur Injektion auf Eis belassen (Stewart 1993; Torres R. and R. 1997).

2.9.5.7 Blastocysten-Injektionen und -Transfer

Die vorbereiteten ES-Zellen (2.9.5.6) wurden mit einem Mikromanipulator (Leica) in prä-kultivierte Blastocysten von CB20-Weibchen mikroinjiziert. Die Injektion von Bruce4-Zellen in CB20-Blastocysten führt zu einem schwarz-weißen Fellchimärismus, während die Injektion von 129/Sv-Zellen zu einem braun- oder schwarz-weißen Fellchimärismus führt.
Pro Blastocyste wurden 10-15 ES-Zellen injiziert. Daraufhin wurden die Blastocysten bis zum Transfer in eine pseudoschwangere Ammenmutter in Blastocysten-Medium bei 37°C belassen. Diese CB20-Weibchen wurden zuvor mit einem vasektomierten Männchen verpaart.
Die Injektionen und Transfers der Blastocysten wurden im Zentrum für Maus-Genetik des Instituts für Genetik der Universität zu Köln durchgeführt.

2.9.6 HTN-Cre-vermittelte *in vitro*-Deletion

Die *in vitro* Deletion von gefloxten Gensegmenten wird mit dem His-TAT-NLS-Cre-(HTNC) System ermöglicht. Die HTN-Cre – ein rekombinantes Protein – wird nach IPTG-Induktion in *E. coli* exprimiert (Peitz et al. 2002). Das aufgereinigte HTN-Cre-Protein wurde mit freundlicher Unterstützung der AG Prof. Dr. Brüning zur Verfügung gestellt.
Zur Anwendung dieser Technik wurden zunächst murine EF-Zellen generiert, welche das *Sfrs10* homozygot-gefloxt trugen (2.9.4.1). Die Embryonen stammten aus der Verpaarung zweier für das *Sfrs10* homozygot-gefloxter Tiere. Die so generierten MEFs wurden vier Stunden vor der HTN-Cre-Behandlung semi-konfluent ausgesät und nach zweimaligem Waschen mit PBS mit 3 µM HTN-Cre in D-MEM/PBS (1:1) oder als Kontrolle nur mit D-MEM/PBS inkubiert. Nach 16-18 h Inkubationszeit wurden die Zellen sorgfältig mit PBS gewaschen und für weitere Analysen nach unterschiedlichen Zeitpunkten (48 h, 96 h, 6 Tage) für die Isolierung von RNA (2.7.11.2) oder Proteinen (2.8.2) geerntet. Die Versuche erfolgten jeweils im Triplikat auf 6-*wells*.

2.10 Arbeiten mit Mäusen

2.10.1 Mausexperimente

Jegliche Arbeiten mit Mäusen wurden nach den Maßgaben des Tierschutzgesetztes durchgeführt. Für die Tierversuche lag die Genehmigung der Bezirksregierung Köln vor (Genehmigungsnummer: 50.203.2-K 38, 19/05). Die Experimente erfolgten nach den vorgegebenen Standards. Die Tiere wurden in der Tiereinheit des Instituts für Genetik der Universität zu Köln gehalten.

2.10.2 Generierung der verschiedenen *Sfrs10*- Maus-Linien

Als Ausgangslinie für alle generierten *Sfrs10*-Linien diente die Linie *Sfrs10*$^{FLneo/+}$. Diese wurde mit Transfektion des pRF-*Sfrs10* in ES-Zellen (2.9.5.1), anschließender Injektion dieser rekombinanten ES-Zellen in Blastocysten und Verpaarung der aus einer dieser chimären Blastocysten entstandenen chimären Maus (♂ #80) generiert. Die *Sfrs10-knock-out*-Linie, in welcher *Sfrs10*-Exon 4 deletiert ist, wurde über Verpaaren der *Sfrs10*$^{FLneo/+}$-Linie mit einer Cre-*Deleter*-Linie (Schwenk et al. 1995) generiert. Letztere exprimiert das Cre-Transgen unter Kontrolle des h*CMV*-Minimalpromotors ubiquitär, womit eine ubiquitäre Deletion des gefloxten *Sfrs10*-Exons 4 erreicht wurde.

Zur Generierung der gefloxten *Sfrs10*$^{FL/FL}$-Linie wurde das FRT-flankierte *Neo*-Gen mittels Verpaarung der *Sfrs10*$^{FLneo/+}$-Linie mit einer Flp-*deleter*-Linie (Rodriguez et al. 2000) deletiert. Das *Neo*-Gen steht unter der Kontrolle eines starken Promotors, welcher die Funktion des *Sfrs10*-Gens zum einen und die benachbarter Gene zum anderen hätte beeinflussen können. Auch das im *Sfrs10*-Gen inserierte 2 kb große *Neo*-Gen selbst hätte zu Beeinträchtigungen der Genfunktion führen können. Das *Neo*-Gen diente der Selektion positiv transfizierter ES-Zellklone und wurde erst *in vivo* deletiert, um eine weitere Modifikation der ES-Zellen und somit eine eventuell verringerte Keimbahntransmissionsrate zu vermeiden.

Mit weiteren Kreuzungen wurde die heterozygote *Sfrs10*$^{FL/+}$-Linie auf Homozygotie des gefloxten Allels verpaart und über konstante Zuchten erhalten. Die *Sfrs10*$^{FL/FL}$-Linie diente der Generierung des *Sfrs10-knock-outs* mit dem Cre-loxP-System in spezifischen Zellen oder Geweben, so dass die Funktionsfähigkeit des Gens in allen anderen Zellen gewährleistet werden musste. Die *Sfrs10*$^{FL/FL}$*; Hb9-Cre*-Linie wurde über Einkreuzen einer *Hb9-Cre*-transgenen Linie (Arber et al. 1999) generiert. Die *Hb9-Cre* wird unter Kontrolle des endogenen *Hb9*-

Promotors exprimiert, womit eine Deletion des gefloxten Allels in *Hb9*-exprimierenden Zellen – größtenteils in Motoneuronen – erzielt wird.

Alle Transgene (*Cre, Flp, Hb9-Cre*) wurden stets im heterozygoten Zustand belassen, um keine falsch-positiven Phänotypen wegen einer Homozygotie dieser Transgene zu generieren. Im Fall der ubiquitär exprimierten Flp-Rekombinase und Cre-Rekombinase wurden die Transgene nach Deletion der rekombinanten Allele über weitere Verpaarungen herausgekreuzt. Da die hier verwendeten ES-Zellen keinen reinen genetischen Hintergrund trugen (V6.5: C57BL/6 und 129/Sv), wurden alle transgenen Linien mit C57BL/6 Hintergrund eingekreuzt und die generierten Linien stets weiter auf C57BL/6 rückgekreuzt, so dass der genetische Hintergrund der beschriebenen Linien bei Konzeption dieses Manuskripts schließlich bei 70-100% C57BL/6 lag. Bei sämtlichen Zuchten wurden Inzestverpaarungen vermieden. Tabelle 2.3 gibt eine Übersicht der generierten *Sfrs10*-Linien und der zu diesem Zweck verwendeten transgenen Linien. Eine Übersicht der Generationsschritte vom pRF-*Sfrs10* bis zu den Linien ist in Form eines Ablaufschaubildes in Abbildung 3.38 (S. 130) dargestellt.

Tabelle 2.3: Übersicht der *Sfrs10*-Mauslinien und der transgenen Linien zu ihrer Generierung

Linie/Allel	Beschreibung	Generierung
Sfrs10$^{FLneo/+}$	Tragen das rekombinante *Sfrs10*-Allel, wie in ES-Zellen: gefloxtes Ex4, *Neo*-Gen flankiert von FRT-Stellen	Nachkommen der *Sfrs10* Chimären #80 mit Keimbahntransmission des rekombinanten *Sfrs10*-Allels
Sfrs10$^{+/-}$	Heterozygoter ubiquitärer *Sfrs10*-*knock-out*; Deletion des gefloxten *Sfrs10* Ex4 und des *Neo*-Gens	Verpaarung von *Sfrs10*$^{FLneo/+}$-Tieren mit Cre-*deleter*-Tieren (Schwenk et al. 1995)
Sfrs10$^{FL/FL}$	Deletion des FRT-umrandeten *Neo*-Gens; *Sfrs10*-Ex4 liegt homozygot gefloxt vor	Verpaarung von *Sfrs10*$^{FLneo/+}$-Tieren mit Flp-*deleter*-Tieren (Rodriguez et al. 2000)
Sfrs10$^{FL/FL}$*; Hb9-Cre*	Deletion des homozygot-gefloxten *Sfrs10*-Ex4 in Motoneuronen	Verpaarungen von *Sfrs10*$^{FL/FL}$-Tieren mit *Hb9-Cre*-transgenen-Tieren (Arber et al. 1999)

2.10.3 Genotypisierung von Mäusen

Die Genotypisierung der Tiere erfolgte per PCR (2.7.7). Bei Generierung einer Mauslinie wurden die PCR-Bedingungen vor einem standardisierten Einsatz etabliert. Bei erstmaliger Genotypisierung einer Mauslinie wurden die jeweiligen Genotypen zusätzlich mittels *Southern Blot*-Analysen verifiziert.

Den Tieren wurde nach dem Setzen von Ohrmarkierungen ein Schwanzspitzenbiopsat (0,3-0,5 cm) entnommen und dieses über Nacht bei 55°C in 500 µl Lysispuffer/Prot.K lysiert. Die DNA-Extraktion erfolgte wie unter 2.7.3.1 beschrieben. Zur Bestimmung des Genotyps wurde 1 µl der DNA-Lösung als PCR-Matrize eingesetzt. Die amplifizierten Produkte wurden

mittels gelelektrophoretischer Analysen (2.7.4.1) ausgewertet. Tabelle 2.4 gibt eine Übersicht der verwendeten PCR-Bedingungen zum standardisierten Genotypisieren der Tiere.

Tabelle 2.4: Übersicht der verwendeten Genotypsierungs-PCRs

Typisierung	Primerpaar	Anlagerungs-temperatur	Fragmentgröße/n
Keimbahntransmission (geflox-tes Allel mit *Neo*-Kassette)	2158/2340	60°C	712 bp
Sfrs10, nur Wildtyp	2339/2340	60°C	621 bp
Flp-Transgen	3099/3100	54°C	350 bp
Neo-Deletion nach Flp	2507/2340	62°C	wt = 717 bp; FL = 846 bp
Neo-Deletion nach Flp	3482/2340	60°C	wt = 821 bp; FL = 950 bp
Sfrs10 –knock-out (Deletion der KO-Region: 11181-11801;619 bp)	3482/3487	58°C	wt = 852 bp; FL = 1,2 kb; KO = 290 bp
Sfrs10-knock-out (Deletion der KO-Region: 11.181-11.801; 621 bp)	2507/3263	58°C	wt = 827 bp; KO = 256 bp; FL = 1,2 kb
Cre-Transgen ubiquitär	3104/3105	60°C	600 bp
Rosa26/LacZ (Soriano 1999)	3590/3591/3592	60°C	wt = 550 bp; tg = 250 bp
Sfrs10, nur KO	3101/3240	58°C	675 bp
Hb9-Cre-Transgen	3140/3141	60°C	750 bp

2.10.4 Präparation von Mäusen und Entnahme von Organen

Die Tötung der Tiere erfolgte per Genickbruch oder mittels CO_2-Begasung. Nach Fixierung der Tiere und Öffnen ihrer Bauchhöhle wurden die zu analysierenden Organe entnommen und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Organe wurden dann bei -80°C gelagert oder direkt weiterverarbeitet (Isolierung von DNA, RNA und/oder Proteinen).

2.10.5 Altersbestimmung pränataler Mausembryonen

Um das spezifische embryonale Entwicklungsstadium zu bestimmen, wurden zeitlich kontrollierte Verpaarungen angesetzt. Wegen der Nachtaktivität der Tiere und einem standardisierten 12stündigen Tag-/Nachtzyklus wird angenommen, dass der Begattungszeitpunkt gegen 24 Uhr stattgefunden hat. Das Männchen scheidet hierbei ein Koagulationssekret aus, welches die Vaginalöffnung des Weibchens für etwa 10 h verschließt und als weißlicher Pfropf (*plug*) sichtbar ist. Der Tag des embryonalen Entwicklungsstadiums (E) wird auf 0.5 dpc festgelegt, wenn am nächsten Morgen solche Vaginalpfropfe festgestellt werden. Der Erfolg dieser Methode liegt bei 60-80%.

2.10.6 Präparation pränataler Mausembryonen

2.10.6.1 Präparation von Morulae (E2.5) und Blastocysten (E3.5)

Zur Präparation von Morulae (E2.5) und Blastulae (E3.5) wurden die trächtigen Weibchen getötet, der Uterus mit Ovarien entnommen und diese mit Pinzetten in PBS von Blut, Fett und dem Mesenterium gesäubert. Daraufhin wurde zur Präparation von Morulae das Ovidukt vom Ovar und Uterus separiert, eine Spritze mit einer feinen Kanüle in das Ovidukt geführt und dieses mit M2-Medium mehrfach gespült. Für die Präparation von Blastocysten (E3.5) wurde eine Spritze in die obere Öffnung des Uterus geführt und dieser mehrfach gespült. Die in eine Petrischale gespülte Flüssigkeit wurde unter einem Stereomikroskop auf Morulae bzw. Blastocysten abgesucht und – soweit vorhanden – mittels eines Schlauches vorsichtig angesaugt. Die Embryonen wurden in eine weitere Petrischale transferiert, in welcher sie jeweils nacheinander in drei Tropfen M2-Medium gesäubert wurden. Die Morulae wurden daraufhin ü.N./37°C in M2-Medium inkubiert, die Blastocysten wurden zur weiteren Analyse jeweils in 0,2 ml Reaktionsgefäße überführt und sofort gekühlt.

2.10.6.2 Präparation älterer Embryonen (E7.5-E13.5)

Zur Präparation von Embryonen zwischen E7.5 und E13.5 wurden die trächtigen Weibchen getötet, der Uterus entnommen und dieser zur Säuberung in eine Petrischale mit PBS transferiert. Zur Präparation von Embryonen früherer Stadien (E7.5-E9.5) wurden die einzelnen Decidua vorsichtig unter einem Stereomikroskop separiert und die Uterushaut mit Mikropinzetten abgetragen. Die Deciduen wurden dann jeweils in eine Präparierschale (6 cm Petrischale mit 2% Agarose in PBS) transferiert, vorsichtig geöffnet und die Embryonen herauspräpariert. Embryonen von Tag E7.5 wurden komplett lysiert und die daraufhin isolierte DNA zur Genotypisierung aufbereitet. Embryonen zwischen E8.5 und E9.5 wurden vorsichtig mittels einer feinen Kanüle aus dem Dottersack geschält, aus welchem die DNA für die Genotypisierung gewonnen wurde.

Die Embryonen wurden unter einem Stereomikroskop (mit freundlicher Unterstützung der AG Prof. Dr. Leptin zur Verfügung gestellt) dokumentiert. Embryonen zwischen Tag E10.5 und E13.5 wurden ohne Stereomikroskop präpariert. Hierbei wurde ein Stück des Schwanzes oder eines Hinterlaufs des Embryos für die Genotypisierung verwendet. Einige der Embryonen (E9.5) wurden für Paraffinschnitte ü.N. in 4% PFA fixiert und entsprechend weiter aufbereitet (2.8.6, 2.8.7, 2.8.8).

3. Ergebnisse

3.1 Analysen *SFRS10*-transgener Mäuse

Die SFRS10-vermittelte Revertierung des *SMN2*-Spleißmusters in einem Zellsystem birgt interessante Ansatzpunkte bezüglich einer Modulation des SMA-Phänotyps (siehe 1.5.4) (Hofmann et al. 2000). Dieser Aspekt wird mit der Beobachtung gestützt, dass die HDAC-Inhibitoren-vermittelte Erhöhung der VL-*SMN2* Transkriptmenge *in vitro* mit einer erhöhten SFRS10-Expression einhergeht (Brichta et al. 2003; Riessland et al. 2006). Die *in vitro* gezeigte Revertierung des *SMN2*-Spleißmusters und somit auch eine potentielle Modulation des SMA-Phänotyps mittels SFRS10 sollten deshalb in einem adäquaten *in vivo*-Modell analysiert werden. Zu diesem Zweck sollte ein SMA-Mausmodell generiert werden, in welchem das humane *SFRS10* neuronal-spezifisch überexprimiert würde. Über Verpaarungen von *SFRS10*-transgenen Tieren mit SMA-Mäusen (*Smn*$^{-/-}$*; SMN2*$^{+/+}$) (Hsieh-Li et al. 2000) sollten letztlich Mäuse mit dem Genotyp *Smn*$^{-/-}$*; SMN2*$^{+/+}$*; SFRS10tg* generiert werden, um den modulierenden Effekt einer neuronalen SFRS10-Überexpression auf das *SMN2*-Spleißmuster *in vivo* analysieren zu können. Da bei der SMA insbesondere die α-Motoneuronen betroffen sind, hätte mit diesem Tiermodell ein modulierender Effekt des Spleißfaktors untersucht werden können.

3.1.1 Vorarbeiten zur Generierung *SFRS10*-transgener Mäuse

Vor Beginn dieser Arbeit wurde ein Konstrukt zur Generierung *SFRS10*-transgener Mäuse kloniert (Yvonne Hofmann, Doktorarbeit). Dieses Konstrukt wurde in Kollaboration mit der AG Prof. Dr. Sendtner, klinische Neurologie der Universität Würzburg, zur Generierung transgener Mäuse verwendet. Abbildung 3.1 zeigt schematisch das Konstrukt, welches zur Generierung *SFRS10*-transgener Tiere verwendet wurde. Die humane *SFRS10*-cDNA sollte mit diesem Konstrukt letztlich unter Kontrolle des *Neurofilament-like*(*NFL*)-Gen-Promotors exprimiert werden. Dieser Promotor ist neuronal spezifisch, so dass *SFRS10* somit auch in α-Motoneuronen exprimiert werden würde. Hierbei ist wegen der Größe von Motoneuronen von einer besonders starken Expression in diesen Zellen auszugehen, da Neurofilamente den Axondurchmesser bestimmen (Hoffman et al. 1987). Die im Konstrukt enthaltene *Neomycin*-Kassette diente der negativen Selektion von transfizierten ES-Zellklonen. Mit einem IRES(***i****nternal* ***r****ibosome* ***e****ntrance* ***s****ite*)-Element vor einem *LacZ*-Reportergen im Konstrukt hätten von einer Matrize zwei Transkripte unter Kontrolle des gleichen Promotors translatiert werden können.

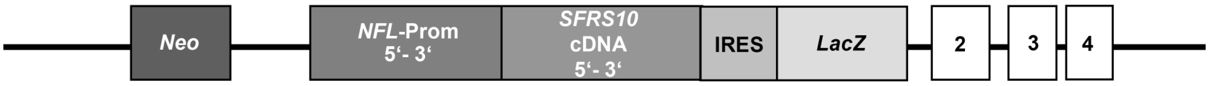
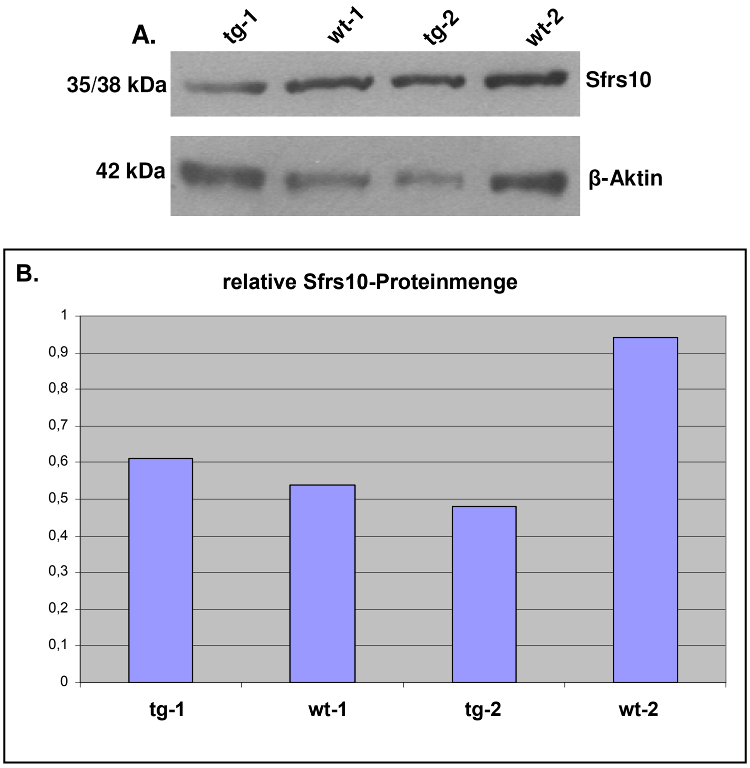


Abbildung 3.1: schematische Darstellung des Vektorkonstruktes zur Generierung *SFRS10*-transgener Mäuse; *Neo* = *Neomycin*-Kassette; *NFL*-Prom = *NFL*-Promotor; IRES = *internal ribosome entrance site; LacZ* = *β-Galactosidase*-Gen.

Das beschriebene Konstrukt wurde in 129/Sv-ES-Zellen transfiziert, und positiv-rekombinante Zellen wurden in C57BL/6-Blastocysten injiziert. Mittels Untersuchungen von Nachkommen der resultierenden chimären Tiere konnte eine Keimbahntransmission des Transgens nachgewiesen werden. An diesem Punkt begann die vorliegende Arbeit an *SFRS10*-transgenen Mäusen. Zunächst sollten mittels quantitativer RNA- und Protein-Expressionsanalysen sichergestellt werden, dass das *SFRS10*-Transgen exprimiert wurde.
Die Haltung der beschriebenen Tiere erfolgte in Würzburg.

3.1.2 *SFRS10*-Expressionsanalysen an adulten Tieren

Um die Präsenz des *SFRS10*-Transgens sicherzustellen, wurden die Tiere vor den Analysen genotypisiert. Da das Transgen unter Kontrolle des neuronal-spezifischen *NFL*-Promotors exprimiert wurde, wurden Proteinextrakte aus dem Rückenmark adulter Tiere hergestellt und mittels *Western Blot*-Analysen (2.8.5) untersucht. Der für diese Analysen verwendete Antikörper detektiert sowohl das humane SFRS10 als auch das murine Protein. Mittels quantitativer Auswertung der *Western Blots* konnte bei keinem der transgenen Tiere eine erhöhte Expression von SFRS10 im Vergleich mit nicht-transgenen Tieren nachgewiesen werden (Abbildung 3.2).
In weiterführenden Untersuchungen wurde eine Quantifizierung von *SFRS10*-Transkripten des Rückenmarks vorgenommen. Hierzu wurden Primer etabliert, die das humane *SFRS10*-Transkript, nicht jedoch das murine Sfrs10 amplifizierten. Auch mit diesen Analysen konnte keine Expression des Transgens an adulten Tieren nachgewiesen werden (siehe auch 3.1.3, Abbildung 3.4).
Neben neuronalen – *NFL*-exprimierenden – Zellen finden sich zahlreiche andere Zelltypen im Rückenmark, so dass eine mangelnde Detektion des exprimierten *SFRS10*-Transgens zu erklären gewesen wäre. Das embryonale Rückenmark weist dagegen einen höheren Anteil an Neuronen auf, so dass für weitere Untersuchungen der *SFRS10*-Transgen-Expression embryonales Material verwendet wurde (siehe 3.1.3).



<u>Abbildung 3.2:</u> Proteinexpression in *SFRS10*-transgenen und wildtypischen Tieren.
A. Autoradiographie eines *Western Blots*. Relative Sfrs10-Proteinmenge; Sfrs10 wurde gegen β-Aktin normalisiert **B**. Quantitative Auswertung der in A. gezeigten Autoradiographie. Es sind keine deutlichen Expressionsunterschiede zwischen *SFRS10*-transgenen und wildtypischen Tieren zu detektieren.

3.1.3 *SFRS10*-Expressionsanalysen an Embryonen

Zur Untersuchung der *SFRS10*-Transgen-Expression an Embryonen wurde Material von Embryonen an Tag E14.5 verwendet. Diese wurden mit freundlicher Unterstützung der AG Prof. Dr. Sendtner, Würzburg, präpariert. Zunächst wurde aus Lungengewebe genomische DNA extrahiert (2.7.3.1) und mit Hilfe einer Transgen-spezifischen PCR der Genotyp der Embryonen bestimmt. Bei vier der acht untersuchten Embryonen konnte das Transgen nachgewiesen werden (Abbildung 3.3.A).

Da mittels der beschriebenen PCR nur von DNA transgener Tiere ein Signal amplifiziert wurde, wurde die Integrität der DNA jedes untersuchten Embryos stets mit einer Kontroll-PCR (Primer: 2339/2340; vgl. Tabelle 2.4) verifiziert.

Aus dem Rückenmark der Embryonen wurde RNA extrahiert und die mittels reverser Transkription synthetisierte cDNA weitergehend untersucht. Zunächst wurde mit einer PCR sichergestellt, dass diese Methode zur Detektion von Motoneuronen-spezifischen Transkripten

sensitiv genug war. Hierbei wurde das Motoneuronen-spezifische Transkript *Hb9* amplifiziert (Abbildung 3.3B). Als Kontrolle diente hierbei stets eine Probe, zu welcher bei der cDNA-Synthese keine reverse Transkriptase zugefügt wurde, um falsch positive Ergebnisse auf Grund von DNA-Kontaminationen ausschließen zu können. Die amplifizierten cDNA-Proben aller untersuchter Embryonen zeigten hierbei ein deutliches Signal.

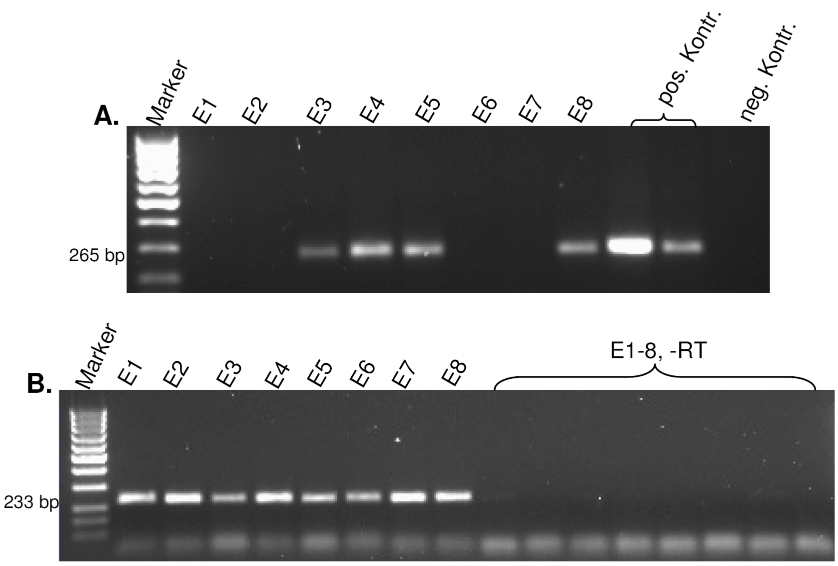
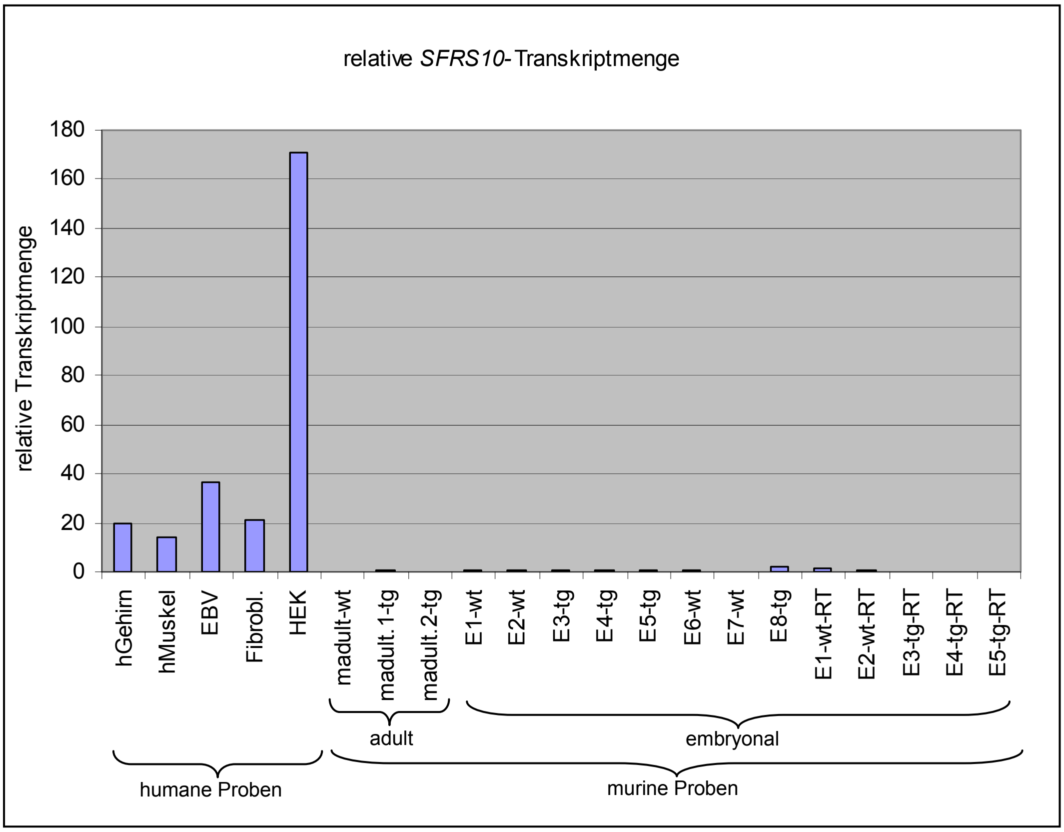


Abbildung 3.3: Detektion des *SFRS10*-Transgens und eines Motoneuronen-spezifischen Transkripts. A./B. Auf Agarose-Gelen separierte PCR-Produkte**. A.** Genotypisierung von E14.5 mit für das *SFRS10*-Transgen-spezifischen Primern (Primer: 1076/3147 = 265 bp). Als Matrize diente DNA aus Lungengewebe. **B.** PCR mit cDNA aus Rückenmark der in A. typisierten Embryonen. Es wurden Primer für das Motoneuronen-spezifische Transkript *Hb9* (Primer: 2887/2888 = 233 bp) verwendet, um die Sensitivität der Methode zu garantieren. Für alle RNAs wurde neben einer cDNA-haltigen Probe eine Negativkontrolle verwendet, bei der keine reverse Transkriptase (-RT) eingesetzt wurde.

Die cDNAs wurden daraufhin mittels *Realtime*-PCRs quantifiziert (Abbildung 3.4), wobei für das humane Transkript spezifische Primer (siehe auch Tabelle 2.2) verwendet wurden. Diese Primer hybridisierten 100%ig an das humane Transkript, wobei der Sinnstrang-Primer vier Fehlbasenpaarungen und der Gegensinnstrangprimer drei Fehlbasenpaarungen in Bezug auf das murine Äquivalent enthielten. Mit Tests an humaner und an wildtypischer muriner cDNA wurde die Spezifität dieser Primer bestätigt, wobei an humanem Material ein eindeutiges Amplifikat und an murinem Material nur ein schwaches Hintergrundsignal detektiert wurde. Die *SFRS10*-Transkript-Quantifizierungen erfolgten relativ zu dem Haushaltsgen *Hmbs* (***h**ydroxy-**m**ethyl**b**ilane **s**ynthase*; Tabelle 2.2). Da die verwendeten Primer human-spezifisch waren und somit keine murinen Positivkontrollen zur Verfügung standen, dienten humane cDNAs als Kontrollproben. Auch der Standard, anhand dessen die *SFRS10*-Transkript-Quantifizierung

erfolgte, wurde dementsprechend mit einer humanen Probe etabliert. Bei diesen Messungen wurden weiterhin Kontrollen einbezogen, in welchen während der cDNA-Synthese keine reverse Transkriptase verwendet wurde. In keinem der vier untersuchten, transgenen Embryonen konnte eine deutliche Expression des *SFRS10*-Transgens nachgewiesen werden (Abbildung 3.4). Bei diesen Messungen stand nicht die Transkriptquantifizierung, sondern die Detektion des humanen Transkripts als solches im Vordergrund. Da ein Transgen oft mehrfach inseriert und unter der Kontrolle starker Promotoren steht, hätte die Expression mit dieser Methode eindeutig nachweisbar sein müssen, zumal der *NFL*-Promotor nicht ausschließlich in Motoneuronen aktiv ist. Auf Grund der mangelnden *SFRS10*-Expression in den transgenen Mäusen wurde auf weitere Analysen und Verpaarungen dieser Tiere verzichtet.



<u>Abbildung 3.4:</u> *SFRS10*-Quantifizierungen in *SFRS10*-transgenen Embryonen.
Die *SFRS10*-Transkriptmenge (Primer 2887/2888) wurde relativ zu *Hmbs* (Primer: 2196/2197) ermittelt. Als Expressionskontrollen wurden cDNAs verschiedener humaner Gewebe und Zelllinien verwendet. Die Genotypen dreier getesteter adulter Tiere (madult) und der getesteten Embryonen sind angedeutet (wt = wildtypisch; tg = transgen); um unspezifische Amplifikationen von genomischer DNA ausschließen zu können, wurden einige RNAs auch ohne reverse Transkriptase behandelt = -RT.
SFRS10 wird in *SFRS10*-transgenen Embryonen nicht exprimiert.

3.2 Generierung eines *Sfrs10-knock-outs* im Mausmodell

Der Spleißfaktor SFRS10 spielt bei der Generierung von VL-*SMN*-Transkripten eine wichtige Rolle (Hofmann et al. 2000) (siehe 1.5.4). Mit früheren Untersuchungen konnte auch eine Beteiligung von SFRS10 an Spleißprozessen der Keimbahn (Venables et al. 2005; Venables et al. 2000) sowie bei neuronalen Prozessen (Chen et al. 2004a; Glatz et al. 2006; Jiang et al. 2003) gezeigt werden (1.4.3). Neben diesen Funktionen ist wenig über das Protein und sein gesamtes Wirkungsspektrum in *Mammalia* bekannt. Aus diesem Grund sollte im Rahmen dieser Arbeit eine Strategie für einen *knock-out* des Gens in der Maus entwickelt und umgesetzt werden. Der *Sfrs10-knock-out* sollte *in vivo* weiteren Aufschluss über die Bandbreite der Funktionen dieses SR-*related*-Spleißfaktors, auch mit besonderem Fokus auf das Spleißen des murinen *Smn* geben. Hierbei sollten über eine adäquate *targeting*-Strategie sowohl ein ubiquitärer Gen-*knock-out* als auch spezifische konditionale *knock-outs* möglich und generiert werden.

3.2.1 Ausschluss von Spleißvarianten des murinen *Sfrs10*

Vom humanen *SFRS10*-Gen werden mindestens fünf verschiedene Spleißisoformen generiert (Nayler et al. 1998), von welchen nur *SFRS10-V1* und *-V3* zu Proteinen translatiert werden (siehe 1.4.1). Ferner ist auch von der Maus bekannt, dass unterschiedliche *Sfrs10*-RNA-Isoformen generiert werden, die sich jedoch nur im 3'-UTR unterscheiden (Segade et al. 1996). Wegen der starken Homologie des murinen Sfrs10 zum humanen SFRS10 mussten vor Planung einer geeigneten *knock-out*-Strategie entsprechende murine Spleißvarianten ausgeschlossen werden. Hierbei wurde der Schwerpunkt der Analysen auf neuronale und muskuläre Gewebe gelegt, da diese bei der SMA betroffen sind und somit im Fokus unserer Analysen standen. Die RNA aus Gehirn- und Muskelgewebe zweier Mausstämme wurde isoliert, revers transkribiert und mittels PCR amplifiziert. Die Primer für diese Reaktion wurden dabei unter Berücksichtigung der humanen Spleißvarianten (1.4.1) konstruiert, so dass bei Vorhandensein muriner Äquivalente auch diese amplifiziert worden wären. Der Sinnstrang-Primer wurde in Exon 1 und der Gegensinnstrangprimer in Exon 7 gelegt, da bis auf *SFRS10-V2* alle bekannten humanen Spleißvarianten diese Exons tragen. Wegen der Abundanz muriner Pseudogene dienten neben Wasser als weitere Negativkontrollen RNAs, welche unter denselben Bedingungen wie die cDNAs behandelt wurden, denen jedoch keine reverse Transkriptase zugefügt wurde. Die PCR-Produkte wurden auf 10%igen PAA-Gelen separiert und mit einer Silberfärbung visualisiert, womit DNA-Fragmente sehr sensitiv detektiert werden können (2.7.4.3). Abbildung 3.5 zeigt ein repräsentatives Gel dieser Analysen. In den untersuchten Geweben beider Mausstämme

wurde nur das dem *SFRS10-V1* entsprechende Transkript detektiert. Es wurden keine murinen *Sfrs10*-Spleißvarianten detektiert.

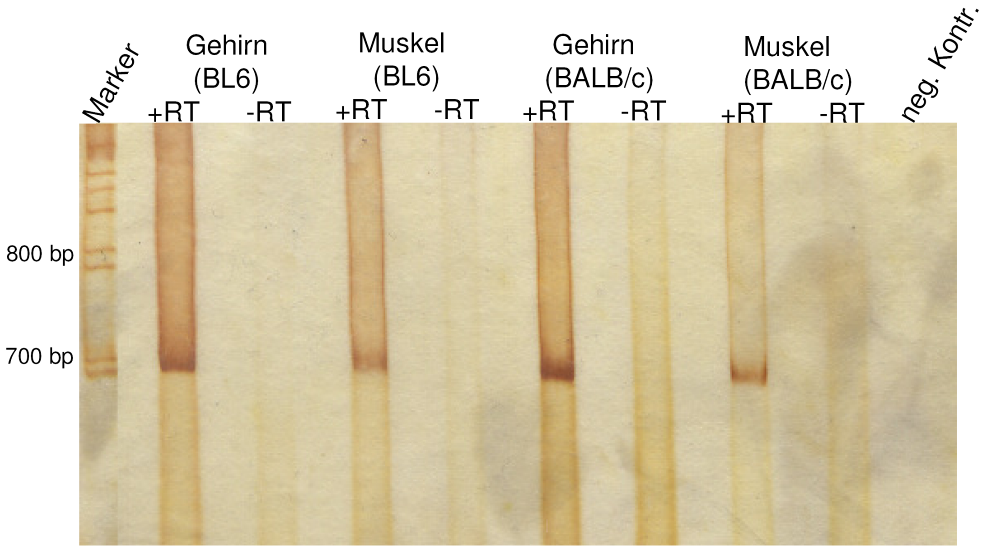


Abbildung 3.5: Analysen von potentiellen *Sfrs10*-Spleißvarianten. Silbergefärbtes PAA-Gel, auf welchem PCR-amplifizierte cDNAs verschiedener Mausstämme und Gewebe separiert und visualisiert wurden. Zum Ausschluss unspezifischer genomischer DNA-Amplifikationen wurde von jeder RNA-Probe auch eine Kontrolle ohne reverse Transkriptase verwendet. BL6 = C57BL/6; +/-RT = mit/ohne reverse Transkriptase. Ex1-Ex7 (Primer: 2154/2003); erwartete Fragmentgrößen: *Sfrs10-v1* = 699 bp; *Sfrs10-v3* = 615 bp; *Sfrs10-v4* = 780 bp. An allen untersuchten Mausstämmen und Geweben wurde ausschliesslich das dem *SFRS10-V1* entsprechende Transkript detektiert.

3.2.2 *Sfrs10-targeting*-Strategie und Konzeption des *targeting*-Konstruktes pRF-*Sfrs10*

Obwohl in Muskel und Gehirn keine murinen Spleißvarianten des *Sfrs10* detektiert wurden (3.2.1), wurde die *knock-out*-Strategie für das murine *Sfrs10* auf Grund der hohen Homologie von SFRS10 und Sfrs10 anhand der vorliegenden Erkenntnisse über die humanen Isoformen (Daoud et al. 1999) konzipiert. Abbildung 3.6 verdeutlicht die hypothetischen *Sfrs10*-Spleißvarianten – die Abbildung wurde anhand der Erkenntnisse über die *SFRS10*-Spleißvarianten erstellt. Der zu deletierende Bereich (KO-Region) selbst wurde im Fall des *Sfrs10-knock-outs* auf Exon 4 und Teile der 5' und 3' angrenzenden intronischen Sequenzen beschränkt. Mit der Klonierung der KO-Region in den *targeting*-Vektor wurde diese an deren 5'- und 3'-Enden mit loxP-Stellen modifiziert, womit eine spätere – Cre-Rekombinase induzierte – Deletion dieser Region ermöglicht wurde (Abbildung 3.7). Wegen der Deletion von Exon 4 käme es in Exon 5 zu der Generierung eines vorzeitigen Stopp-Codons und somit bei der Translation zu einem frühzeitigen Kettenabbruch, so dass kein funktionelles Protein

enstünde. Alle bekannten humanen *SFRS10*-Spleißvarianten mit Ausnahme von *SFRS10-V2*, welches nicht translatiert wird, tragen Exon 4. Somit könnte mit der beschriebenen *Sfrs10-knock-out*-Strategie keine der Isoformen generiert werden – falls diese auch von dem murinen Äquivalent transkribiert bzw. translatiert würden. Abbildung 3.6 zeigt die hypothetischen murinen *Sfrs10*-Spleißvarianten, die mit der Deletion des Exons 4 alle erfasst werden.

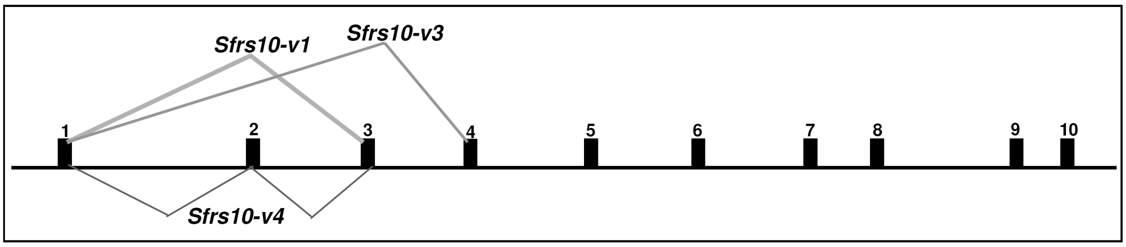


Abbildung 3.6: Hypothetische Spleißvarianten des murinen *Sfrs10*; in Anlehnung an die identifizierten humanen SFRS10-Spleißvarianten. Die Unterschiede der Spleißisoformen in den vorderen Exons sind mit Linien angedeutet. Alle Spleißisoformen enthalten Exon 4-10. Über die Deletion von Exon 4 werden alle Spleißisoformen erfasst.

Die genomischen Bereiche 5' und 3' der KO-Region dienten der homologen Rekombination in das ES-Zell-Genom (5'- und 3'-Box). Da die Elemente über Restriktionsschnittstellen in den *targeting*-Vektor kloniert werden sollten, musste für jedes einzelne ein Restriktionsenzym gewählt werden, welches den Zielvektor zur Linearisierung nur einmal schnitt, um anschließenden das entsprechende Fragmentes einbringen zu können. Das zu klonierende Fragment durfte keine Restriktionsschnittstelle für das gewählte Enzym aufweisen. Tabelle 3.1 zeigt eine Übersicht der zur Konzeption des pRF-*Sfrs10* amplifizierten und klonierten Elemente. In der genomischen *Sfrs10*-Sequenz (Anhang, Kapitel 8.4) sind die Primer zur Amplifikation der Elemente markiert.

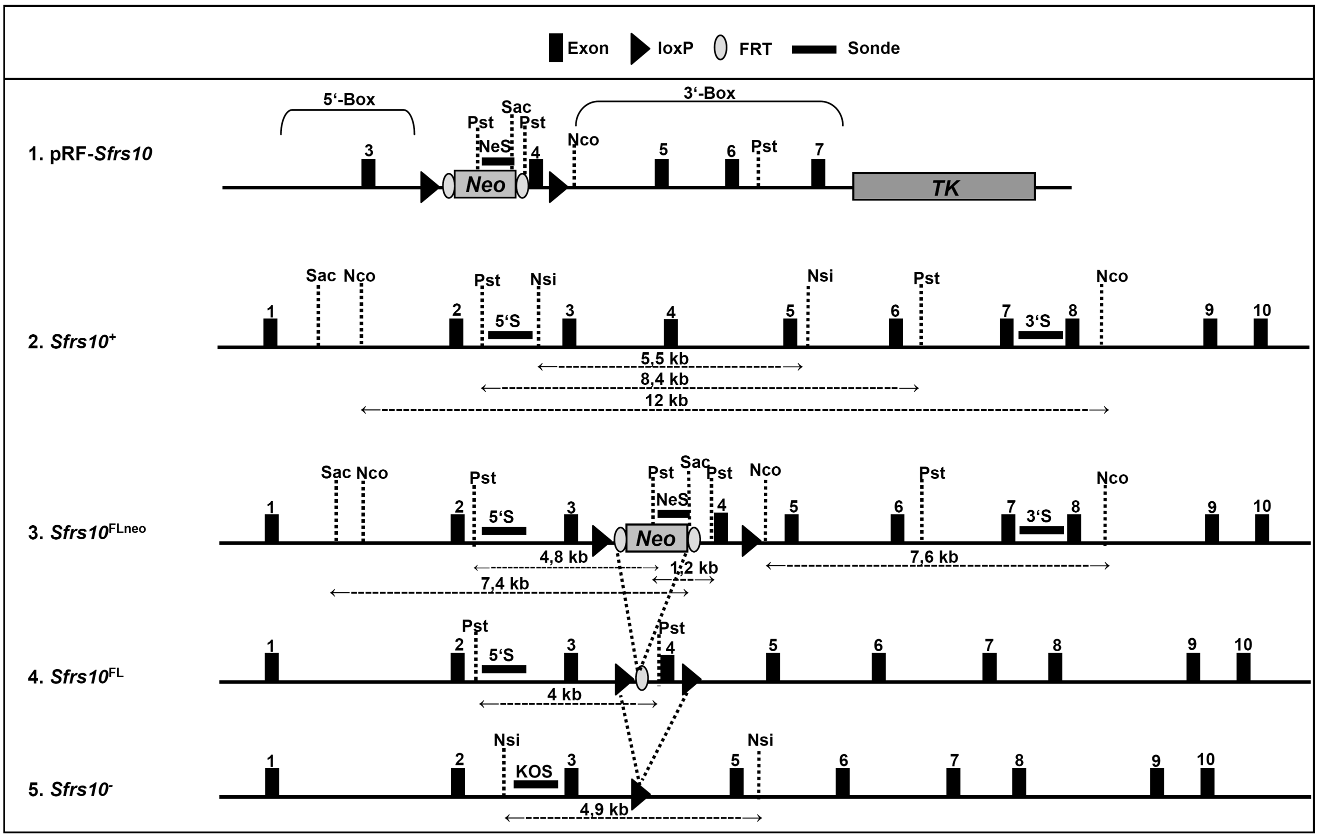
Tabelle 3.1: Elemente zur Generierung des pRF-*Sfrs10*

Element	genomische Lokalisation*;Größe (bp)	Intron(s) (I)	Exon(s) (Ex)	Primer; Restriktionsschnittstelle/-enzym	GVO# TOPO	GVO# pRF
5'-Box	8032-11.174; 3142 bp	I2, I3	Ex3	2406/2407; BamH I	TOPO XL GVO#276; Klon 8	5'-Box in pRF-3'-Box; GVO#C2
KO-Region	11.181-11.801; 619 bp	I3, I4	Ex4	2339/2340; Sal I	TOPO 2.1 GVO#275 Klon 7	KO in pRF-5'-/-3'-Box; GVO#282; Klon B2.3; komplettierter pRF-*Sfrs10*
3'-Box	11.802-17.006 5204 bp	I4, I5, I6, I7	Ex5, Ex6, Ex7	2341/2342; Xho I	TOPO XL GVO#278 Klon 6	3'-Box in pRF; GVO#280; Klon 8.2
*Die Angaben liegen der genomischen *Sfrs10*-Sequenz (NC_000082) zugrunde.						

Ein *targeting*-Konstrukt beinhaltet verschiedene Charakteristika, um die Klonierung der modifizierten genomischen Fragmente für eine homologe Rekombination bzw. für den Gen-*knock-out* einerseits, sowie eine hohe Transfektionseffizienz und die Selektion positiv rekombinanter ES-Zellen andererseits gewährleisten zu können. Der hier verwendetet Ausgangsvektor pRapidflirt (pRF; Anja Brühl und Ari Waisman, unveröffentlicht) trug neben den erwähnten loxP-Stellen ein Ampicillinresistenz-Gen, welches der Selektion transformierter Bakterien bei den einzelnen Klonierungsschritten diente. Eine FRT-flankierte *Neomycin*-Kassette und eine *Thymidinkinase*-Kassette dienten der Selektion positiv-transfizierter und homolog-rekombinanter ES-Zell-Klone. Die FRT-Stellen ermöglichten eine spätere *in vivo*-Deletion des *Neomycin*-Gens mittels der Flp-Rekombinase. Eine Vektorkarte und die Sequenz des verwendeten Ausgangsvektors pRF mit wichtigen Primern und Restriktionsschnittstellen sind in Kapitel 8.2.3 und 8.3 (im Anhang) zu finden.

Mit der Wahl adäquater Restriktionsschnittstellen bzw. -enzyme und Sonden für *Southern Blot*-Analysen wurde ferner eine Strategie zur Detektion und Verifizierung positiv homolog-rekombinanter ES-Zell-Klone, sowie der Verifizierung der genetischen Veränderungen des *Sfrs10*-Gens in der Maus entwickelt. Hierbei wurden externe Sonden verwendet. Mit diesen Sonden sollte sichergestellt werden, dass die ES-Zellen pRF-*Sfrs10* nur einmal homolog integriert hatten, so dass die Sequenz der Sonden nicht Teil des Konstruktes selber sein durfte. Die Sonden wurden 5' vor bzw. 3' hinter diese Region gelegt. Mit der Neo-Sonde sollte sichergestellt werden, dass die Klone das Konstrukt nicht mehrfach integriert hatten. Dazu wurden Restriktionsschnittstellen gewählt, die 5' und 3' außerhalb des zu rekombinierenden Bereiches lagen. Bei der Hybridiserung mit der Neo-Sonde wurde somit ein Fragment definierter Größe detektiert, die abweichte, wenn eine nicht-homologe Rekombination stattgefunden hatte.

Abbildung 3.7 zeigt die *targeting*-Strategie des *Sfrs10* in einer Übersicht.



<u>Abbildung 3.7:</u> *Sfrs10-targeting*-Strategie; Restriktionsschnittstellen (gestrichelte Linien), Positionen von *Southern*-Sonden (S) sowie resultierende Fragmentgrößen sind angedeutet; *Neo* = FRT-flankierte *Neomycin*-Kassette; *TK* = *Thymidinkinase*-Kassette; KO = *knock-out*; NeS = Neo-Sonde; **1.** pRF-*Sfrs10*; die 5'- und 3'-Boxen, sowie die loxP-flankierte KO-Region sind angedeutet. **2.** wildtypisches *Sfrs10*-Gen; **3.** *Sfrs10*-Gen nach homologer Rekombination des pRF-*Sfrs10* (ES-Zellen bzw. Mäuse nach Keimbahntransmission); **4.** *Sfrs10*-Gen nach Deletion der *Neomycin*-Kassette über Flp-Rekombinase-induzierte Rekombination (Mäuse/MEFs mit gefloxtem *Sfrs10*); **5.** *Sfrs10*-Gen nach Deletion der KO-Region über die Cre-Rekombinase-induzierte Rekombination zwischen den beiden loxP-Stellen (KO-Maus/MEFs).

3.2.3 Generierung und Verifizierung des *targeting*-Konstruktes pRF-*Sfrs10*

Die zur Amplifikation des KO-Bereichs und der 5'- und 3'-Boxen verwendeten Primer (Tabelle 3.1) wurden jeweils mit den gewählten Restriktionsschnittstellen modifiziert, so dass die amplifizierten Fragmente die Schnittstelle (siehe Tabelle 3.1) am 5'- und 3'-Ende trugen. Als Matrize dieser PCRs diente jeweils Plasmid-DNA eines mPACs (Maus-Pac, MPMGc121D18638Q2; RZPD, Berlin), welcher das murine *Sfrs10* trägt. Nachfolgend wurden die PCR-Produkte direkt (2.7.7.1) oder aus Agarosegelen aufgereinigt (2.7.4.2) und je nach Größe in TOPO-2.1 (KO-Bereich) oder TOPO-XL (5'-Box und 3'-Box) zwischenkloniert (2.7.2.1). Zur Generierung des pRF-*Sfrs10* wurden die entsprechenden TOPO-Vektoren mit den adäquaten Restriktionsendonucleasen behandelt (2.7.9) und die zu klonierenden Elemente aus einem Agarosegel aufgereinigt (2.7.4.2). Schließlich wurden diese mit dem Zielvektor pRF ligiert und mittels Elektro-

schock in DH5α-Zellen eingebracht (2.7.2.2). Die einzelnen Elemente des pRF-*Sfrs10* – KO-Bereich, 5'-Box und 3'-Box wurden nacheinander in pRF kloniert. Dabei wurde zunächst die KO-Region (621 bp) mit dem Enzym Sal I, darauf die 3'-Box (5,2 kb) mit Xho I und schließlich die 5'-Box (3,1 kb) mit dem Enzym BamH I einkloniert. Die Fragmente wurden nach jeder Klonierung mittels Testrestriktionen und Sequenzierungen (2.7.5) auf die Richtigkeit ihrer Sequenz überprüft und bestätigt. Schließlich wurde das komplettierte *targeting*-Konstrukt (pRF-*Sfrs10*), welches alle drei Fragmente trug, mittels Testrestriktionen und Sequenzierungen verifiziert. Hierbei wurden für die Testrestriktionen neben den für die Klonierungen verwendeten Enzymen, auch weitere verwendet, um ein möglichst breites Spektrum an verschiedenen Fragmentierungen und somit eine ausführliche Analyse des pRF-*Sfrs10* zu erhalten (Tabelle 3.2, Abbildung 3.8). Für die Sequenzierungen wurden neben den einklonierten Fragmenten auch wichtige Vektorelemente wie die *Neomycin*-Kassette und die *Thymidinkinase*-Kassette, welche von Bedeutung für die spätere Selektion transfizierter ES-Zellen waren, überprüft und bestätigt. Tabelle 3.2 gibt eine Übersicht der zur Verifizierung des pRFs-*Sfrs10* verwendeten Restriktionsendonucleasen und der entstehenden Fragmentgrößen. Abbildung 3.8 zeigt die elektrophoretisch aufgetrennten Testrestriktionen des pRF-*Sfrs10*.

Tabelle 3.2: Übersicht der für die Testrestriktion des pRF-*Sfrs10* verwendeten Enzyme und der enstehenden Fragmente

Enzym	Fragment-anzahl	Fragmentgröße/n
Sal I	2	pRF = 15,2 kb; KO = 621 bp
BamH I	2	pRF = 12,7 kb; 5'-Box = 3,1 kb
Xho I	2	pRF = 10,6 kb; 3'-Box = 5,2 kb
Not I	1	pRF-*Sfrs10* (linearisiert) = 15,8 kb
Bsm I	4	6,7 kb; 5,4 kb; 1,98 kb; 1,7 kb
BsaW I	8	7,9 kb; 4 kb; 1,6 kb; 831 bp; 535 bp; 526 bp; 308 bp; 147 bp
Hinc II	8	5,2 kb; 4,5 kb; 3,2 kb; 1,1 kb; 700 bp; 627 bp; 597 bp; 9 bp (nicht sichtbar)
Hind III	7	6,1 kB; 3,8 kb; 1,9 kb; 1,7 kb; 1,2 kb; 920 bp; 243 bp
Nco I	4	7 kb; 6,1 kb; 1,5 kb; 1,3 kb
Pst I	6	7,7 kb; 4,5 kb; 1,2 kb; 1,1 kb; 1,1 kb; 840 bp; 451 bp
Bgl II	8	4,4 kb; 3,9 kb, 3 kb; 2,2 kb; 1,4 kb; 565 bp; 166 bp; 34 bp (nicht sichtbar)

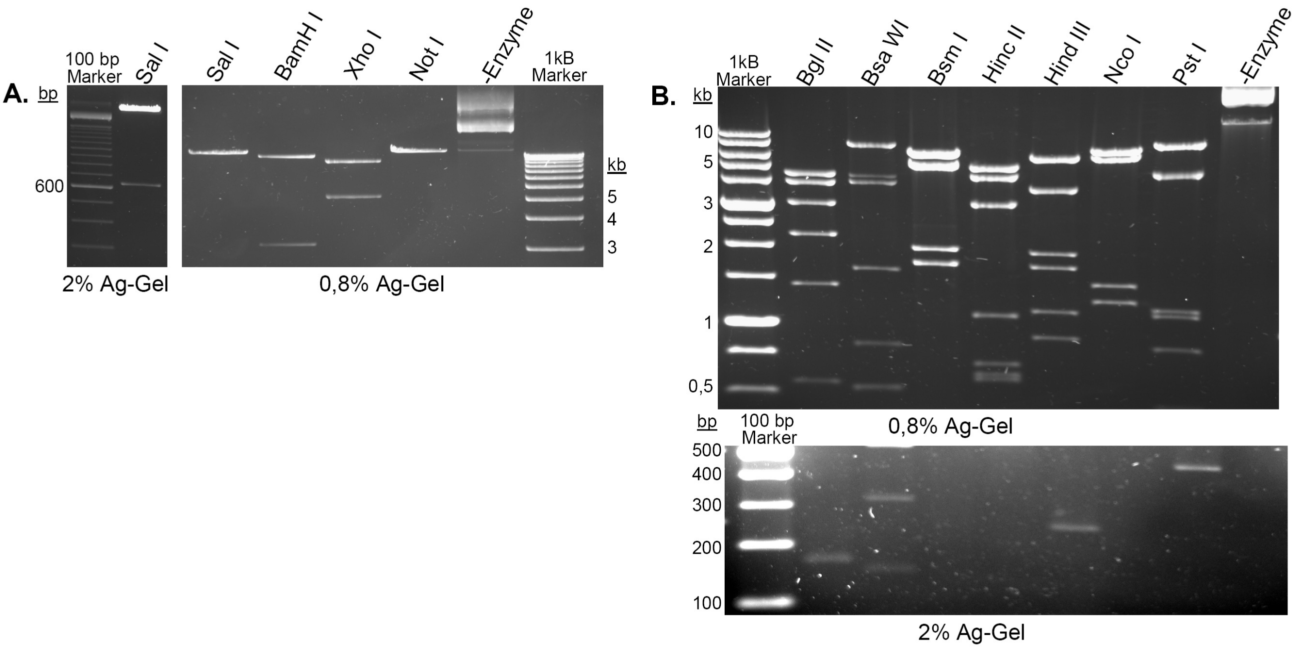


Abbildung 3.8:Verifizierung des pRF-*Sfrs10*. Auf einem Agarose-Gel separierte Produkte der Testrestriktionen mit pRF-*Sfrs10*. **A.** Restriktion von pRF-*Sfrs10* mit den für die Klonierungen verwendeten Restriktionsendonucleasen. **B.** Restriktion von pRF-*Sfrs10* mit verschiedenen Endonucleasen.

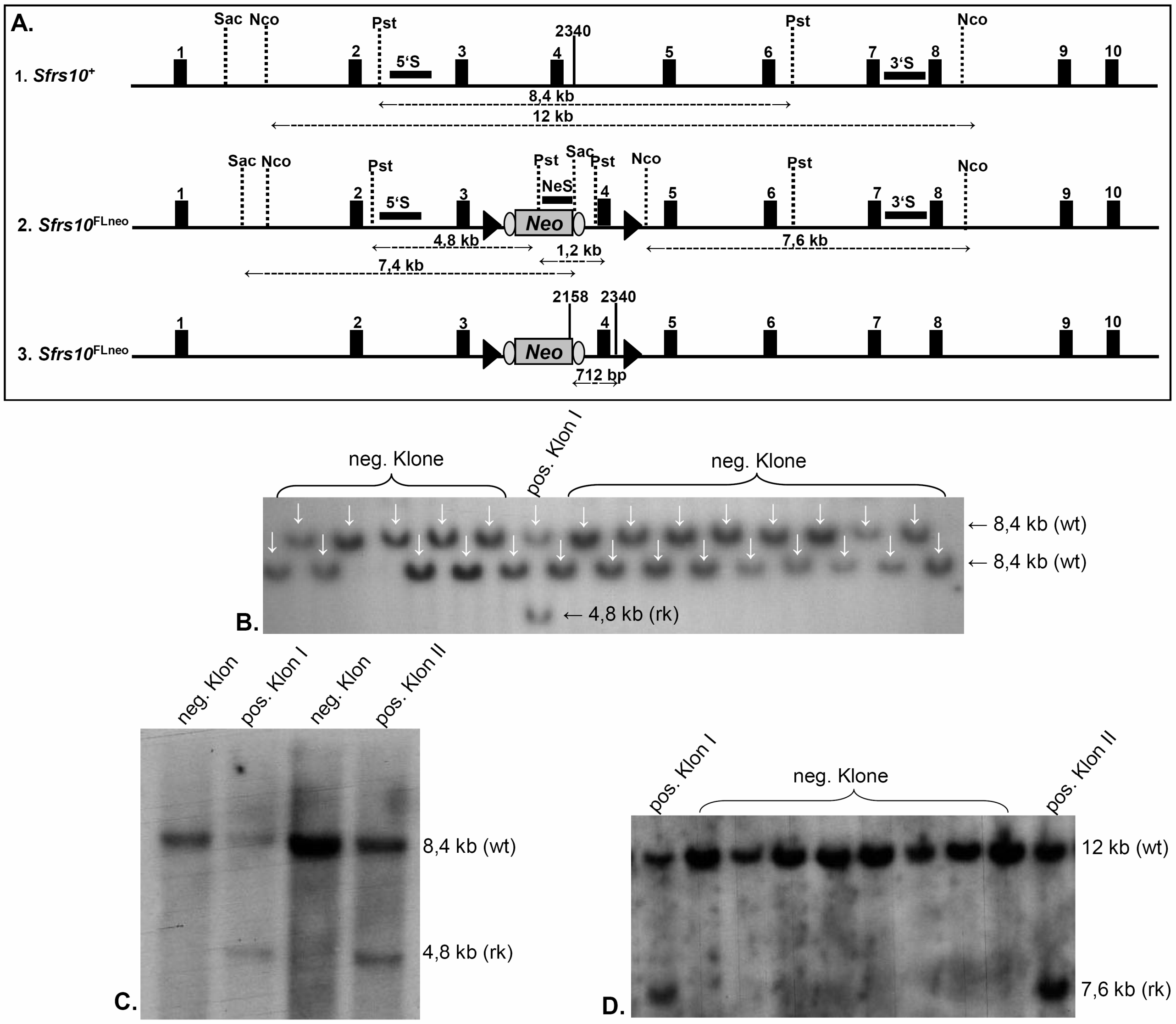
3.2.4 Detektion und Verifizierung positiver Klone nach Transfektion des pRF-*Sfrs10* in ES-Zellen

Nach der Verifizierung des komplettierten pRF-*Sfrs10* mit verschiedenen Testrestriktionen und Sequenzierungen (3.2.3), wurde das Konstrukt in ES-Zellen transfiziert. Zu diesem Zweck wurde pRF-*Sfrs10* aufgereinigt (2.7.2.2) und pro Transfektionsansatz wurden 40-50 µg mit dem Enzym Not I linearisiert. Die Transfektion erfolgte wie unter 2.9.5.1 beschrieben. Nach den Selektionsschritten mit G418 und Ganciclovir (2.9.5.2) wurden verbleibende ES-Zell-Klone isoliert (2.9.5.3) und mittels zuvor etablierten *Southern Blot*-Anlaysen (2.7.10) auf homologe Rekombination getestet (2.9.5.4) (Abbildung 3.9). Nach dem Expandieren (2.9.5.5) als rekombinant identifizierter Klone wurden diese mittels weitergehender *Southern*-Analysen verifiziert (Abbildung 3.9C/B, Abbildung 3.10). Die *Southern*-Sonden wurden mittels PCR amplifiziert, wobei der mPAC-*Sfrs10* (RZPD, Berlin) als Matrize diente. Tabelle 2.1 gibt eine Übersicht der verwendeten Sonden, der Primer zu ihrer Generierung und der entsprechenden Restriktionsenzyme, welche in *Southern*-Analysen verwendet wurden.

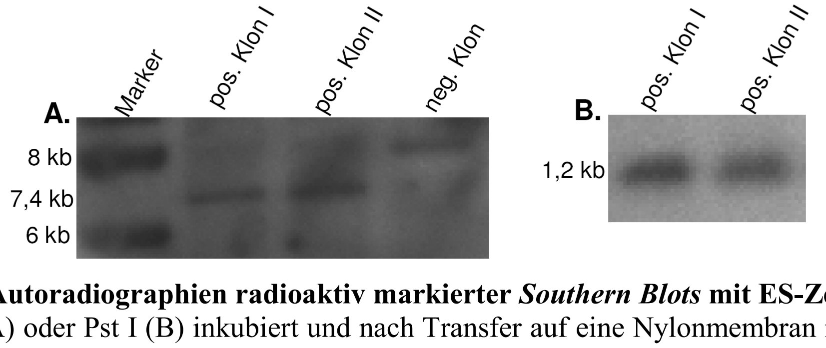
Die Transfektionsexperimente erfolgten zunächst in Bruce4-ES-Zellen mit reinem C57BL/6-genetischen Hintergrund (Kontgen et al. 1993), da die zu generierenden *Sfrs1*0-Linien letztlich mit diesem genetischen Hintergrund untersucht werden sollten. Von den Klonen, welche die

Selektionsschritte überlebt hatten, wurden 500 isoliert, expandiert und mittels *Southern*-Analysen auf die homologe Rekombination des rekombinanten *Sfrs10* untersucht. Diese Analysen wurden im großen Maßstab zunächst nur mir der 5'-Sonde, nach Restriktion der DNA mit Pst I durchgeführt. Von den 500 untersuchten Klonen konnten zwei als positiv für die homologe Rekombination des modifizierten *Sfrs10* identifiziert werden (Klone A9, E6) (siehe 2.6.4.3). Dies entspricht einer Rekombinationsrate von 4 in $1x10^3$. Nach Expandieren und weiteren A-nalysen dieser Klone mittels *Southern*-Analysen mit der 5'-, der 3'- und der *Neo*-Sonde konnten diese Klone eindeutig als homolge Rekombinanten verifiziert werden (Abbildung 3.9B, C Abbildung 3.10). Nach Injektion dieser Klone in CB20-Blastocysten wurden chimäre Mäuse (Abbildung 3.11A) generiert, welche – wie sich über weitere Verpaarungen mit C57BL/6-Tieren und Genotypisierung ihrer Nachkommen zeigte – keine Keimbahntransmission des rekombinanten *Sfrs10*-Allels trugen (siehe auch 3.2.5, 3.2.6). Aus diesem Grund erfolgte ein weiteres Transfektionsexperiment in V6.5-ES-Zellen mit einem hybriden genetischen Hintergrund (C57BL/6 und 129/Sv) (Eggan et al. 2002). Nach den Selektionsschritten wurden 400 der überlebenden V6.5-Klone isoliert, expandiert und mittels *Southern*-Analysen untersucht. Vier dieser Klone (B8, G6, G10, H6) konnten als eindeutig homolog-rekombinant für das modifizierte *Sfrs10* identifiziert und verifiziert werden. Dies entspricht einer Rekombinationseffizienz von 1 in $1x10^2$.

Abbildung 3.9A verdeutlicht die *Southern*-Strategie zur Identifizierung und Verifizierung homolog-rekombinanter ES-Zell-Klone. Abbildung 3.9B zeigt die Ergebnisse von *Southern Blot*-Analysen der isolierten Klone mit der 5'-Sonde. Für den positiven Klon sind deutlich die wildtypische und die rekombinante Bande zu erkennen. Abbildung 3.9C und D zeigen verifizierende Ergebnisse mit der 5'- und der 3'-Sonde nach Expandieren der Klone – mit beiden Sonden sind bei positiven Klonen sowohl die wildtypische, als auch die rekombinante Bande zu erkennen. Abbildung 3.10 zeigt die Ergebnisse der *Southern*-Analysen mit der Neomycin-Sonde, wobei die Fragmentierung der DNA mit zwei verschiedenen Restriktionsenzymen durchgeführt wurde. Bei den als positiv identifizierten Klonen ist jeweils nur eine Fragmentbande der erwarteten Größe zu erkennen, während ein negativer Klon in Abbildung 3.10A eine Fragmentbande abweichender Größe aufweist. Somit konnte ausgeschlossen werden, dass die mit der 5'- und der 3'-Sonde als homolog-rekombinant identifizierten Klone pRF-*Sfrs10* ein weiteres Mal – nicht-homolog – integriert hatten.



<u>Abbildung 3.9:</u> Identifizierung und Verifizierung homolog-rekombinanter ES-Zell-Klone.
A. *Southern*- und PCR-Strategie zur Detektion homolog-rekombinanter Klone bzw. einer Keimbahntransmission; **B-D.** Autoradiographien von radioaktiv markierten *Southern Blots* mit ES-Zell-DNA; die DNA wurde mit Pst I (B und C) oder Nco I (D) inkubiert und nach Transfer auf eine Nylonmembran mit der 5'-Sonde (B, C) oder der 3'-Sonde (D) hybridisiert. Positive Klone zeigen zwei Fragmentbanden. **B.** Ausschnitt einer Autoradiographie eines *Southern Blot*s der Klon-*screenings* mit je 120 DNA-Proben pro Gel, welche in Doppelreihen aufgetragen wurden. Jeder Pfeil markiert eine DNA-Probe. **C./D**. Autoradiographie eines *Southern Blots*, bei welchem DNA expandierter Klone verwendet wurde.



<u>Abbildung 3.10:</u> Autoradiographien radioaktiv markierter *Southern Blots* mit ES-Zell-DNA; die DNA wurde mit Sac I (A) oder Pst I (B) inkubiert und nach Transfer auf eine Nylonmembran mit der *Neo*-Sonde hybridisiert. Positive Klone zeigen ein Fragment definierter Größe (Sac I = 7,4 kb; Pst I = 1,2 kb).

3.2.5 Injektion rekombinanter ES-Zellen in Blastocysten und Generierung chimärer Mäuse

Die ES-Zell-Klone, bei welchen eindeutig die homologe Rekombination des modifizierten *Sfrs10* nachgewiesen worden war (3.2.4), wurden expandiert. Im Zentrum für Maus-Genetik der Universität zu Köln wurden schließlich jeweils 10-15 dieser ES-Zellen sowohl in CB20- als auch in C57BL/6-Blastocysten injiziert. Diese manipulierten Embryonen wurden in scheinschwangere Ammenmütter transferiert werden konnten (2.9.5.6, 2.9.5.7). Der Grad an Chimärismus der so generierten Tiere wurde im Fall der Injektion von ES-Zellen in CB20-Blastocysten über den Fellfarbenchimärismus (Abbildung 3.11) bestimmt. Beide verwendeten ES-Zelllinien stammen von dunkelfarbigen Tieren, während CB20-Blastocysten von weißfarbigen Tieren herrühren. Die dunklen Farbanteile im Fell der chimären Tiere mussten somit von den rekombinanten Zellen gebildet worden sein. Im Fall der Verwendung von C57BL/6-Blastocysten konnte der Grad an Chimärismus nicht bestimmt werden. Den Tieren wurde ein Schwanzspitzenbiopsat entnommen, aus welchem DNA isoliert wurde. Mit einer anschließenden – für das rekombinante *Sfrs10*-Allel spezifischen – PCR (siehe auch 3.2.6) konnten die Mäuse als chimär identifiziert werden.

Wie bereits unter 3.2.4 beschrieben, führte die Injektion von Bruce4-Zellen (Klone A9 und E6) in ~50 CB20- und ~40 C57BL/6-Blastocysten nach ihrem Transfer zur Generierung von drei schwach chimären Tieren (~20%, ~30%, ~35-40%) und zur Generierung von drei C57BL/6-Tieren unbekannten Chimärismusgrades. Abbildung 3.11A zeigt zwei der chimären Männchen, die mit Injektion von Bruce4-ES-Zellen in CB20-Blastocysten generiert wurden. Anhand der schwarzen Pigmentanteile im Fell der Tiere lässt sich eine Chimärismusrate von etwa 20% (Männchen links) und 35-40% abschätzen.

Von den homolog-rekombinanten V6.5-ES-Klonen wurden zwei (G6 und B8) (siehe 2.6.4.3) in insgesamt 58 CB20-Blastocysten und 79 C57BL/6-Blastocysten injiziert. Nach Transfer wurden 19 Nachkommen geboren, darunter drei chimäre Tiere (2x je ~80%, ~45%). Abbildung 3.11B zeigt ein hochchimäres Männchen (~80%; Klon G6), das über die beschriebenen Techniken generiert wurde.

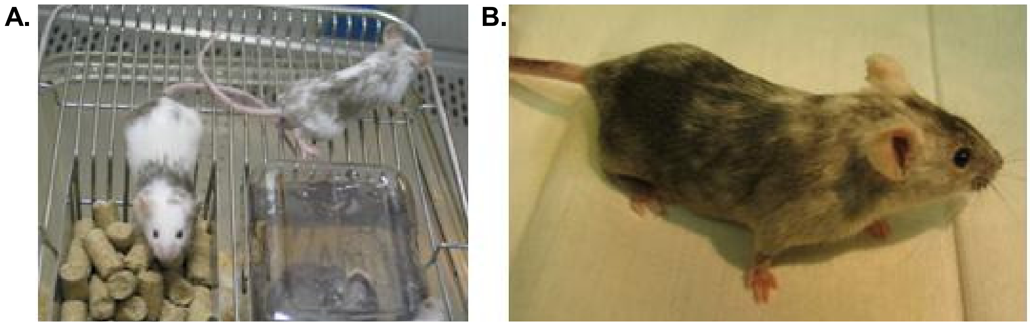


Abbildung 3.11: Chimäre Mäuse, die mittels Injektion der rekombinanten *Sfrs10*-ES-Zellen in CB20-Blastocysten generiert wurden. **A**. Chimäre Männchen, die mit der Injektion von Bruce4-ES-Zellen generiert wurden. **B**. hochchimäres Männchen #80, das mit der Injektion von V6.5-ES-Zellen generiert wurde.

3.2.6 Identifizierung und Verifizierung der Keimbahntransmission des rekombinanten *Sfrs10*-Gens

Die beschriebenen chimären Tiere (3.2.5) wurden im Folgenden mit C57BL/6-Tieren weiterverpaart, um zu überprüfen, ob die rekombinanten ES-Zellen auch zur Entwicklung von Keimbahnzellen dieser Tiere beigetragen hatten. Nur in diesem Fall war eine Vererbung des rekombinanten *Sfrs10* möglich. Da chimäre Tiere meist sowohl wildtypische als auch rekombinante Keimzellen bilden und somit bis zur Detektion einer Keimbahntransmission oftmals viele Nachkommen untersucht werden müssen, wurden präferenziell chimäre Männchen mit mehreren C57BL/6-Weibchen weiterverpaart. Im Fall der ersten Experimente mit Bruce4-ES-Zellen konnte die Keimbahngängigkeit des rekombinanten Allels an der Fellfarbe der Nachkommen solcher Verpaarungen überprüft werden. Da die „schwarzen" rekombinanten Bruce4-ES-Zellen bei Keimbahngängigkeit und anschließender Befruchtung einer C57BL/6-Blastocyste zur Generierung schwarzer Nachkommen geführt hätten, wären solche Nachkommen in diesem Fall eindeutig zu identifizieren gewesen. Dagegen würden von der „weißen" Akzeptor-CB20-Blastocyste abstammende Keimzellen bei Befruchtung einer C57BL/6-Blastocyste zur Generierung brauner Nachkommen führen. Trotz zahlreicher Verpaarungen und Generierung von ~90 Nachkommen, konnte mit den rekombinanten Bruce4-ES-Zellen keine Keimbahntransmission erzielt werden. Aus diesem Grund wurde pRF-*Sfrs10*, wie beschrieben (3.2.4), erneut in V6.5-ES-Zellen transfiziert, die nach der Injektion in Blastocysten und dem anschließenden Transfer in eine Ammenmutter auch zu der Generierung chimärer Tiere beitrugen (3.2.5). Diese chimären Tiere wurden ebenfalls mit C57BL/6-Tieren verpaart, um die Keimbahngängigkeit der rekombinanten ES-Zellen zu untersuchen. Da bei den Nachkommen solcher Verpaarungen auf Grund des hybriden genetischen Hintergrunds der V6.5-ES-Zellen keine Fellfarbenselektion

möglich war, wurde bei Erreichen des Absatzalters ein Schwanzspitzenbiopsat entnommen und die daraus gewonnene DNA mit einer spezifischen PCR überprüft. Die Primer für diese Reaktion wurden so gewählt, dass nur Tiere, welche das rekombinante Allel nun im heterozygoten Zustand trugen, jedoch keine wildtypischen detektiert wurden (vgl. Abbildung 3.9A). Hierbei diente DNA der homolog-rekombinanten ES-Zellen als Positivkontrolle. Da mit der beschriebenen PCR nur ein Fragment von genetisch rekombinanten Tieren amplifiziert wurde, wurde die Integrität der DNA stets mit einer Kontroll-PCR (Primer: 2339/2340; vgl. Tabelle 2.4) verifiziert. Bei dem chimären Männchen #80 (Injektion von Klon G6; Abbildung 3.11B) konnte schließlich mittels der geschilderten Analysen die Keimbahntransmission der rekombinanten ES-Zellen gezeigt, und über weitergehende Untersuchungen mit *Southern Blot*-Analysen verifiziert werden. In Abbildung 3.9A sind die PCR- und *Southern*-Strategien zur Identifizierung und Verifizierung der Keimbahntransmission verdeutlicht, Abbildung 3.12 zeigt die Ergebnisse dieser Analysen. Die Nachkommen der Chimäre #80 mit dem Genotyp *Sfrs10*$^{FLneo/+}$ wurden zur Generierung der verschiedenen *Sfrs10*-Mauslinien unterschiedlich verpaart (siehe auch 2.10.2 und 3.3).

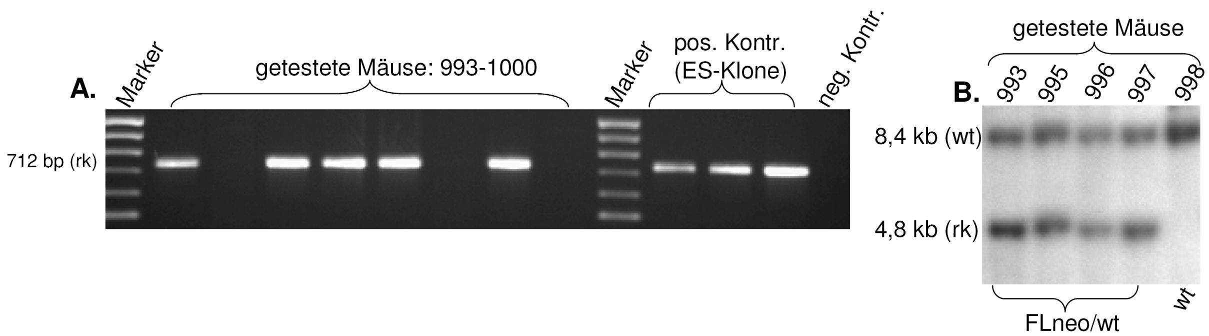


Abbildung 3.12: Identifizierung und Verifizierung der Keimbahntransmission des rekombinanten *Sfrs10*. A. Auf einem Agarose-Gel separierte PCR-Produkte einer Keimbahntransmission-spezifischen PCR (2158/2340). Als Matrize diente Schwanzspitzen-DNA. Nur bei DNA von Tieren, welche das rekombinante *Sfrs10* tragen, wird ein Fragment von 712 bp amplifiziert. **B**. Autoradiographie eines *Southern Blots* zur Verifizierung der Keimbahntransmission. Schwanzspitzen-DNA wurde mit Pst I fragmentiert und nach Transfer mit der 5'-Sonde hybridisiert. Die Genotypen sind angedeutet. Tiere, die das rekombinante (rk) *Sfrs10* tragen, zeigen neben der wildtypischen(wt)-Bande (8,4 kb) eine rk-Bande (4,8 kb). A. und B. Die Identifikationsnummern der Tiere sind angegeben.

3.3 Generierung der unterschiedlichen *Sfrs10*-Maus-Linien

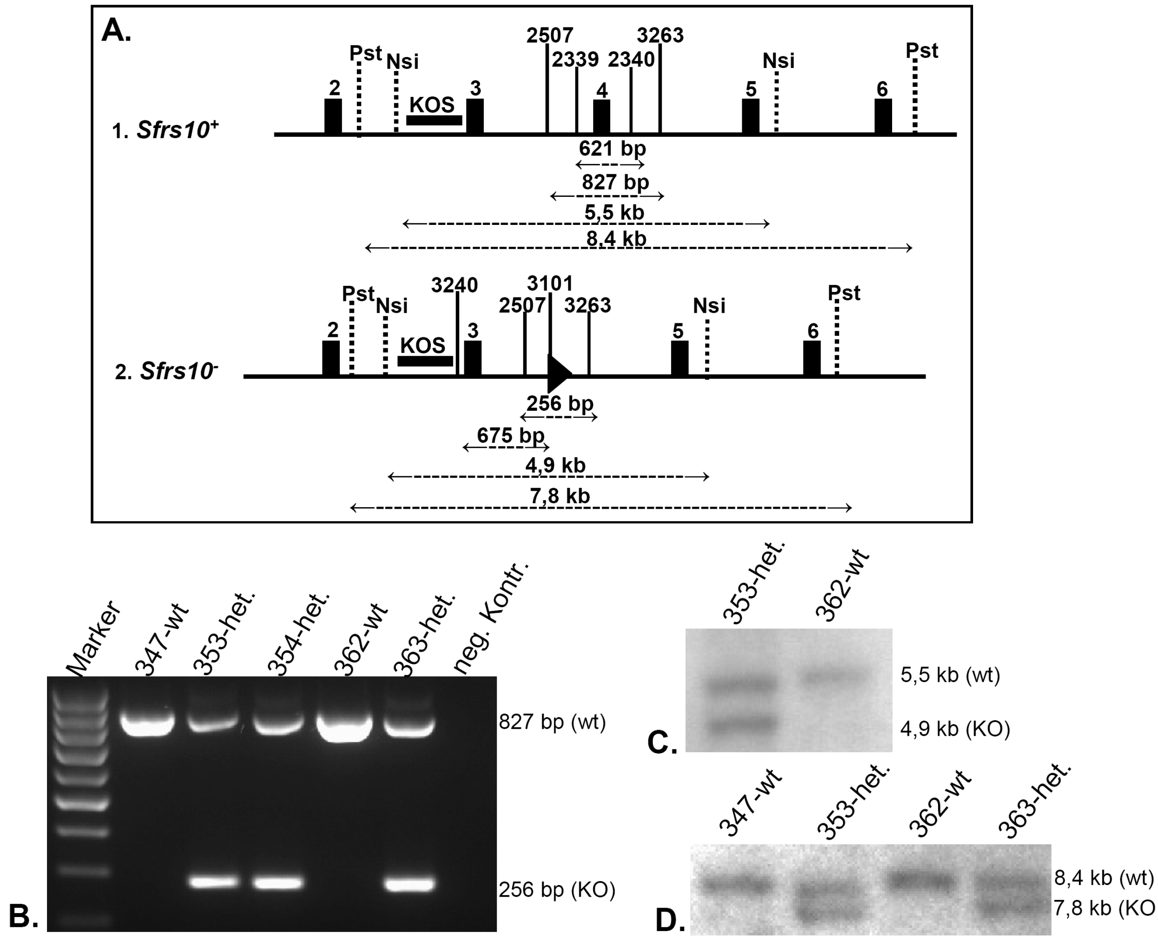
Die beschriebene *Sfrs10*$^{FLneo/+}$-Linie (3.2.6) diente als Ausgangslinie für die verschiedenen während dieser Arbeit generierten *Sfrs10*-Linien. Da die *Sfrs10*-KO-Region wegen des verwendeten *targeting*-Konstruktes mit loxP-Stellen modifiziert wurde, konnte der *Sfrs10-knock-out* sowohl ubiquitär als auch spezifisch konditional erfolgen. Die einzelnen *Sfrs10*-Linien wie auch die transgenen Mauslinien zu ihrer Generierung sind unter 2.10.2 erläutert. Eine Übersicht der allelischen Situation der Linien ist in Abbildung 3.7 dargestellt. Abbildung 3.38 zeigt ein Ablaufschaubild der einzelnen Schritte zur Generierung der verschiedenen Linien.

3.4 Generierung und Analysen eines ubiquitären *Sfrs10-knock-outs* im Mausmodell

3.4.1 Generierung und Identifizierung einer ubiquitären *Sfrs10-knock-out*-Maus

Nachdem mit den vorangegangenen Analysen (3.2.6) die Keimbahntransmission der für *Sfrs10* rekombinanten ES-Zellen und somit die Generierung heterozygoter *Sfrs10*$^{FLneo/+}$ -Mäuse gelungen war, sollte mittels weiterer Verpaarungen dieser Tiere eine *Sfrs10-knock-out*-Linie generiert werden. Da ein *targeting*-Vektor für einen konditionalen *knock-out* verwendet wurde, über welchen die zu deletierende Region mit loxP-Stellen flankiert wurde, musste die Deletion dieser Region mit der Cre-Rekombinase induziert werden. Um Aufschlüsse über die Auswirkungen einer *Sfrs10*-Deletion zu bekommen, sollte zunächst ein ubiquitärer *Sfrs10-knock-out* untersucht werden. Aus diesem Grund wurden *Sfrs10*$^{FLneo/+}$-Tiere mit einer transgenen Cre-*deleter*-Linie verpaart, die die Rekombinase unter der Kontrolle des *CMV*-Promotors ubiquitär exprimiert (Schwenk et al. 1995). Die DNA der so generierten Nachkommen wurde mit PCR-Analysen untersucht. Da über Induktion der Deletion der gesamte loxP-flankierte Bereich deletiert wurde (KO-Region und *Neo*-Kassette) waren heterozygote *knock-out*-Tiere eindeutig wegen des Vorhandenseins zweier Fragmentbanden zu identifizieren. Hierbei wurde sowohl ein wildtypisches als auch ein kleineres KO-Fragment amplifiziert (Abbildung 3.13B. Tiere mit dem Genotyp *Sfrs10*$^{FLneo/+}$, welche die Cre-Rekombinase und somit die Deletion nicht trugen, zeigten nur die wt-Bande, da die Primer die *Neo*-Kassette flankierten und diese wegen ihrer Größe von 2 kb und der gewählten Extensionszeit (45 sek) nicht amplifiziert wurde. Daneben wurde eine für das *Cre*-Transgen spezifische PCR (siehe Tabelle 2.4) durchgeführt. Der Genotyp der so identifizierten heterozygoten *knock-out*-Mäuse wurde mit weiteren *Southern*-Analysen verifiziert (Abbildung 3.13C/D). Abbildung 3.13 zeigt die PCR- und *Southern*-

Strategie zur Identifizierung und Verifizierung des ubiquitären *Sfrs10-knock-outs* und die Ergebnisse dieser Analysen.



<u>Abbildung 3.13</u>: Identifizierung des ubiquitären heterozygoten *Sfrs10 knock-outs*.
A. PCR- und *Southern*-Strategie zur Identifizierung und Verifizierung des *Sfrs10* KOs. PCR-Primer (Linien), Restriktionsschnittstellen (gestrichelte Linien) und resultierende Fragmente sind angedeutet. **1**. wt-Allel, **2.** KO-Allel. **B.** Auf einem Agarose-Gel separierte PCR-Produkte zur Identifizierung des deletierten *Sfrs10* Allels. Als Matrize diente Schwanzspitzen-DNA, welche mit den Primern 2507/3263 amplifiziert wurde. Bei heterozygoten Tieren sind sowohl die wildtypische Fragmentbande (827 bp), als auch die KO-Bande (256 bp) zu erkennen. **C**. Autoradiographie eines *Southern Blots* zur Verifizierung des heterozygoten *knock-outs* von *Sfrs10*. Schwanzspitzen-DNA wurde mit Nsi I fragmentiert und nach Transfer mit der KO-Sonde hybridisiert. **D.** Autoradiographie eines *Southern Blots* zur Verifizierung des heterozygoten *knock-outs* von *Sfrs10*. Schwanzspitzen-DNA wurde mit Pst I fragmentiert und nach Transfer mit der 5'Sonde hybridisiert. **B.-C.** Die Identifikationsnummern und der Genotyp der Tiere sind jeweils angegeben.

3.4.2 Analysen heterozygoter *Sfrs10-knock-out*-Mäuse

Die identifizierten heterozygoten *Sfrs10-knock-out*-Mäuse (3.4.1) zeigten keine phänotypischen Auffälligkeiten verglichen mit wildtypischen Geschwistern des gleichen Wurfs. Die Tiere waren lebensfähig, fertil und hatten keine verminderte Lebenserwartung. Diese Beobachtungen wurden an etwa 200 heterozygoten *Sfrs10-knock-out*-Tieren gemacht. Aus Platzmangel wurden jedoch nicht alle Tiere bis zu ihrem natürlichen Tod gehalten. Die ältesten Tiere waren bei Endfassung dieser Arbeit ~1½ Jahre alt, zeigten typische Seneszenz-Erscheinungen und wurden daher getötet.

Im Absatzalter von 3-4 Wochen wurde das Gewicht der Tiere bestimmt, wobei keine signifikanten Abweichungen zu wildtypischen Mäusen gemessen wurden (Abbildung 3.14). Das leicht erhöhte Gewicht von *Sfrs10*$^{+/-}$-Weibchen wurde den normalen Gewichtsschwankungen von Tieren verschiedener Würfe zugeschrieben.

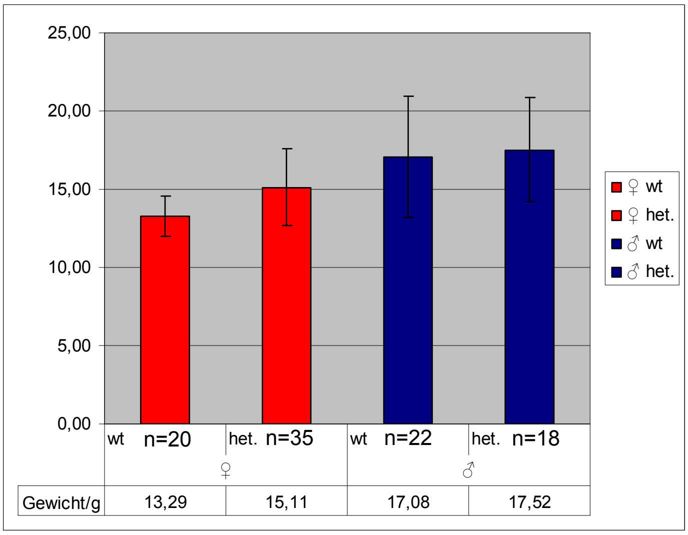
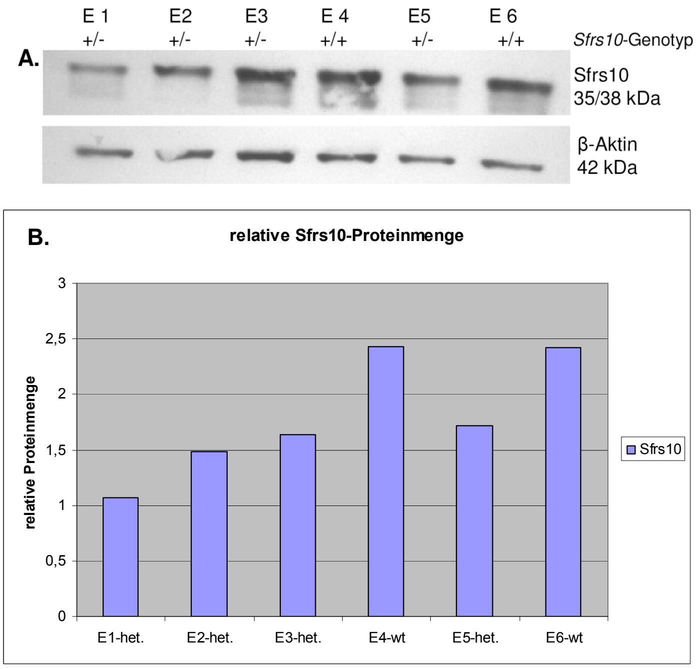


Abbildung 3.14: Durchschnittliches Gewicht wildtypischer und heterozygoter *Sfrs10-knock-out*-Mäuse im Absatzalter (3-4 Wochen). *Sfrs10*$^{+/-}$-Tiere zeigen keine Abweichungen vom Normalgewicht.

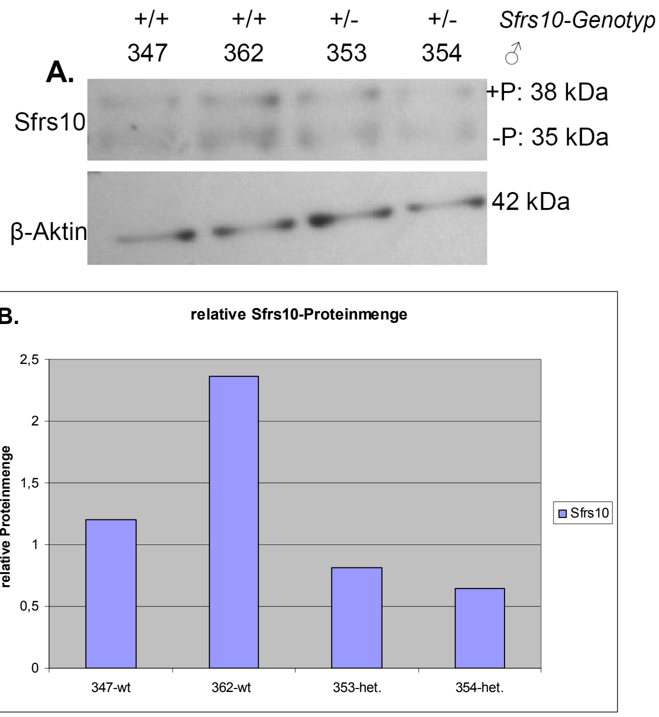
3.4.2.1 Sfrs10-Proteinexpression an heterozygoten *Sfrs10-knock-out*-Mäusen

Da die heterozygoten KO-Mäuse keinen augenscheinlichen Phänotyp aufwiesen, wurden für weitere Analysen Proteinlysate aus verschiedenen Geweben und aus embryonalem Material (E12.5) hergestellt und auf die Expression von Sfrs10 untersucht. Zuvor wurde mit entsprechenden PCRs der Genotyp der Tiere bestimmt. Für die Untersuchungen der embryonalen Proteine wurden je 7,5 µg und für Gewebeproteine adulter Tiere 5-7,5 µg in *Western Blot*-Analysen verwendet. Die Proteinmengen wurden in mehreren Experimenten über Quantifizie-

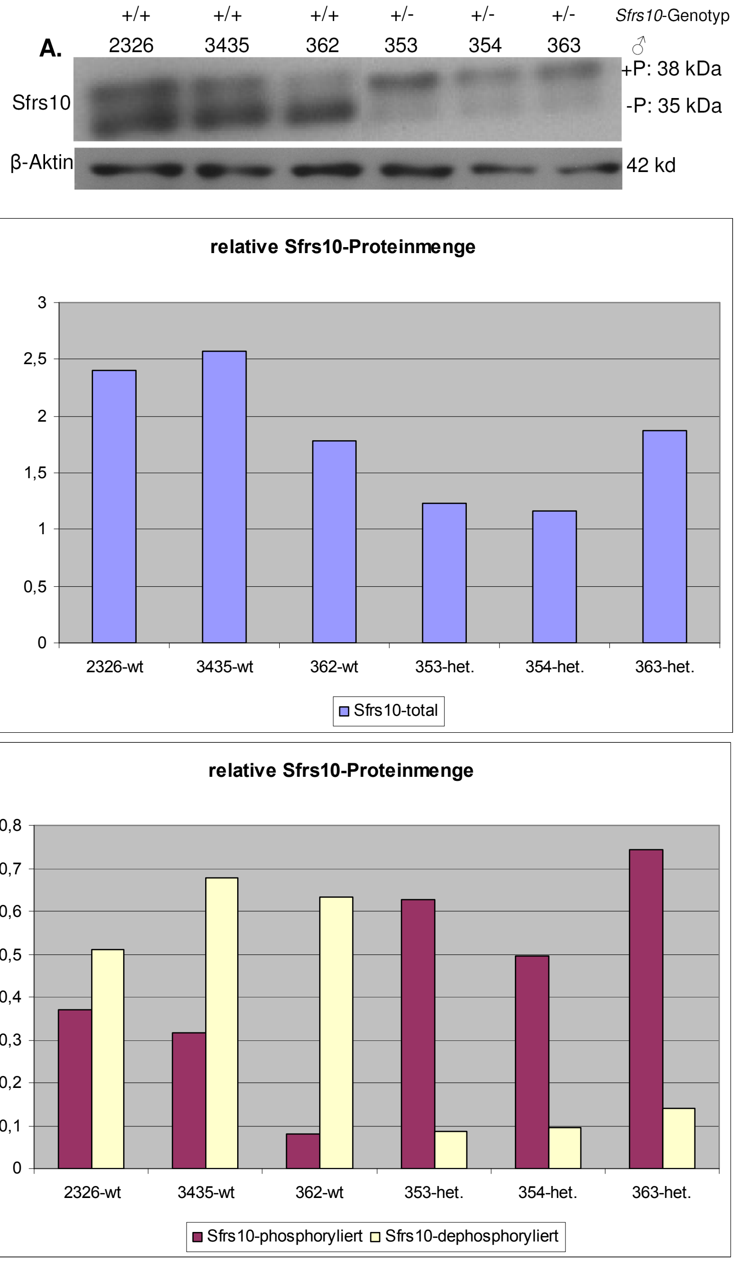
rung der Aktin-Banden angepasst und die Blots erst bei angepassten Proteinmengen ausgewertet. Da Sfrs10 in zwei Formen (de-/phosphoryliert) vorkommen kann und diese sich nur geringfügig in ihrer Größe unterscheiden (~35/~38 kd), wurden für eine optimale Auftrennung dieser Formen 10%ige PAA-Gele verwendet (siehe auch Abbildung 3.16, Abbildung 3.17).
Bei den Analysen embryonaler Proteine konnte an heterozygoten *Sfrs10-knock-out*-Embryonen eine Tendenz zu einer geringeren Sfrs10-Expression (30-40%) im Vergleich mit wildtypischen Embryonen der gleichen Präparation gezeigt werden. Diese Abweichungen waren gering, wurden jedoch mit wiederholten Analysen bestätigt. Abbildung 3.15 zeigt die Autoradiographie eines *Western Blots* mit Proteinen von Embryonen (E12.5) und dessen Quantifizierung.
Für die Untersuchungen an adulten Tieren wurden vier Männchen eines Wurfes verwendet, deren Genotyp mittels PCR determiniert wurde. In Proteinextrakten aus Gehirn dieser Tiere wurde die Sfrs10-Menge bestimmt (Abbildung 3.16). Für die Expressionsanalysen an Testis wurden neben diesen Tieren weitere Männchen untersucht (Abbildung 3.17). Mittels quantitativer Auswertungen der Blots von Proteinen aus Gehirnextrakten konnte – wie auch für die Analyse embryonaler Proteine – die Tendenz zu einer geringeren Expressionsrate von Sfrs10 in *Sfrs10*$^{+/-}$-Tieren (30-40%) im Vergleich mit *Sfrs10*$^{+/+}$-Tieren gezeigt werden. In Abbildung 3.16 sind die Ergebnisse der *Western*-Analysen von Gehirnproteinen dargestellt.
Die Ergebnisse der quantitativen Auswertungen von *Western*-Analysen der Testisproteine zeigten wiederum eine Tendenz zu einer geringeren Expression der Sfrs10-Gesamtproteinmenge (30-40%) bei *Sfrs10*$^{+/-}$-Männchen (Abbildung 3.17B). Bei Quantifizierung der phosphorylierten und der unphosphorylierten Sfrs10-Proteinform ergab sich eine deutliche Abweichung von Anteilen der Proteinformen zwischen *Sfrs10*$^{+/-}$- und *Sfrs10*$^{+/+}$-Tieren (Abbildung 3.17A/C). Hierbei wurde eine Revertierung des Vorkommens der Formen zugunsten der phosphorylierten Form in *Sfrs10*$^{+/-}$-Mäusen offensichtlich. Dies war bereits mit reiner Visualisierung der Banden deutlich zu erkennen (Abbildung 3.17A). Interessanterweise zeigten sich bei *Sfrs10*$^{+/-}$-Männchen jedoch keine Fertilitätseinschränkungen. Die Kreuzungen mit wildtypischen oder auch heterozygoten *Sfrs10-knock-out*-Weibchen erzielten geläufige Wurfgrößen (6-10), wobei bei heterozygoten Weibchen wegen des Fehlens von *Sfrs10*$^{-/-}$-Nachkommen leicht verminderte Wurfgrößen beobachtet werden konnten (4-8; siehe 3.4.3). Bei der Konzeption dieser Arbeit waren selbst die ältesten Männchen von 1-1½ Jahren noch zeugungsfähig und führten in Verpaarungen zu Würfen geläufiger Größen.



<u>Abbildung 3.15</u>: *Western Blot*-Analysen von Embryonen (E12.5). Die Genotypen der Embryonen sind angedeutet. **A**. Autoradiographie eines *Westerns Blots* mit α-Sfrs10 und α-β-Aktin. **B**. Quantitative Auswertung der Autoradiographie. Relative Sfrs10-Proteinmenge; Sfrs10 wurde gegen β-Aktin normalisiert. Heterozygote *Sfrs10-knock-out*-Embryonen zeigen eine 30-40%ige Reduktion der Sfrs10-Proteinmenge.



<u>Abbildung 3.16:</u> *Western Blot*-Analysen von Gehirnproteinen adulter *Sfrs10*$^{+/+}$- und *Sfrs10*$^{+/-}$-Mäuse. Die Genotypen der Tiere sind angedeutet. Relative Sfrs10-Proteinmenge; Sfrs10 wurde gegen β-Aktin normalisiert. **A.** Autoradiographie eines *Westerns Blots* mit Gehirnproteinen. **B**. Quantitative Auswertung der in A. gezeigten Autoradiographie. Heterozygote *Sfrs10-knock-out* Tiere zeigen eine 30-40%ige Verminderung der Sfrs10-Proteinmenge.



<u>Abbildung 3.17:</u> *Western Blot*-Analysen von Testisproteinen adulter *Sfrs10*$^{+/+}$- und *Sfrs10*$^{+/-}$-Männchen. Die Genotypen der Tiere sind angedeutet. **A**. Autoradiographie eines *Western Blots*, in welchem Sfrs10 und β-Aktin gefärbt wurden. **B.** und **C.** Quantitative Auswertungen der Autoradiographie. Relative Sfrs10-Expression; Sfrs10 wurde gegen β-Aktin normalisiert. **B**. Gesamt-Sfrs10-Proteinmenge **C**. Sfrs10-Proteinmenge phosphoryliert/dephosphoryliert. Heterozygote *Sfrs10-knock-out*-Männchen zeigen eine Verminderung der Gesamt-Sfrs10-Proteinmenge um 30-40%. Während bei wildtypischen Männchen vermehrt die dephosphorylierte Sfrs10-Form vorkommt, ist in heterozygoten *Sfrs10-knock-out*-Männchen vermehrt die phosphorylierte Proteinform zu finden.

3.4.3 Homozygoter *knock-out* des *Sfrs10*

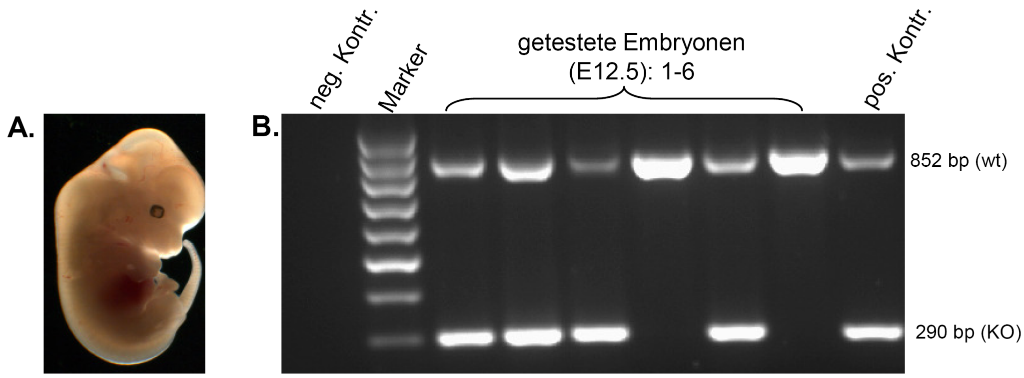
Die unter 3.4.2 beschriebenen heterozygoten *Sfrs10-knock-out*-Mäuse wurden zur Generierung und Analyse homozygoter *Sfrs10-knock-out*-Tiere untereinander weiterverpaart. Über PCR-Analysen der ersten Nachkommen im Absatzalter (P21) konnten keine *Sfrs10*$^{-/-}$-Tiere detektiert werden, so dass auch der Genotyp der vor diesem Absatzalter verstorbenen Neugeborenen bestimmt wurde. In keinem der untersuchten Würfe konnten *Sfrs10*$^{-/-}$-Tiere nachgewiesen werden. Tabelle 3.3 zeigt eine Übersicht der mittels Interkreuzungen von *Sfrs10*$^{+/-}$-Tieren generierten Nachkommen und deren Genotypen. Die geschilderten Ergebnisse führten zu der Annahme, dass der homozygote *knock-out* von *Sfrs10* zur embryonalen Letalität führte. Diese Vermutung wurde über die Tatsache bekräftigt, dass auch über Interkreuzungen der Ursprungslinie *Sfrs10*$^{FLneo/+}$ keine Nachkommen mit Homozygotie des gefloxten Allels mit integrierter Neo-Kassette detektiert werden konnten (Tabelle 3.3). Die *Neomycin*-Kassette unterbricht das endogene *Sfrs10*-Gen und steht zudem unter der Kontrolle eines starken Promotors, so dass ein Funktionsverlust des Gens auf diesem Weg nicht auszuschließen ist.

Tabelle 3.3: Anzahl und Genotypen postnataler Nachkommen aus Interkreuzungen von *Sfrs*$^{+/-}$- und *Sfrs*$^{FLneo/+}$ -Mäusen

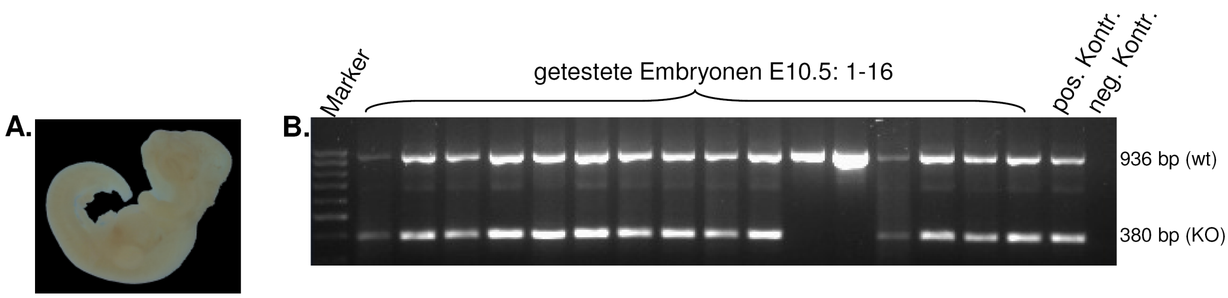
***Sfrs10*$^{+/-}$ x *Sfrs10*$^{+/-}$**			***Sfrs10*$^{FLneo/+}$ x *Sfrs10*$^{FLneo/+}$**	
Genotyp	**Anzahl (%)**	**erwartet**	**Genotyp**	**Anzahl (%)**
Sfrs10$^{+/+}$ (wt)	56 (35%)	25%	*Sfrs*$^{+/+}$ (wt)	11 (34,4%)
Sfrs10$^{+/-}$ (het. KO)	104 (65%)	50%	*Sfrs*$^{FLneo/+}$	21 (65,6%)
Sfrs10$^{-/-}$ (hom. KO)	0 (0%)	25%	*Sfrs*$^{FLneo/FLneo}$	0 (0%)

3.4.3.1 Präparative Analysen zur Bestimmung des Zeitpunkts der Letalität von *Sfrs10*$^{-/-}$-Embryonen

Um den Zeitpunkt zu determinieren, an welchem der homozygote *knock-out* des *Sfrs10*$^{-/-}$ zum Tode der Embryonen führte, wurden im Folgenden sukzessiv Embryonen verschiedener Stadien präpariert (2.10.6, 2.10.6), deren Genotypen mit PCR-Analysen der extrahierten DNAs bestimmt wurden. Hierbei wurden zunächst ältere Embryonen untersucht. Abbildung 3.18 und Abbildung 3.19 zeigen die Ergebnisse für jeweils eine dieser Analysen von Embryonen an E12.5 bzw. E10.5. Der Genotyp dieser Embryonen wurde mittels *Southern*-Analysen verifiziert. Auch mit wiederholten Präparationen konnte zu diesem Entwicklungsstadium kein homozygoter *Sfrs10-knock-out*-Embryo nachgewiesen werden (siehe auch Tabelle 3.4, S.108). Da in diesen Stadien vermehrt resorbierte Embryonen beobachtet wurden (siehe Tabelle 3.4, S.108), wurde der Zeitpunkt ihrer Letalität einer früheren Embryonalphase zugeordnet.



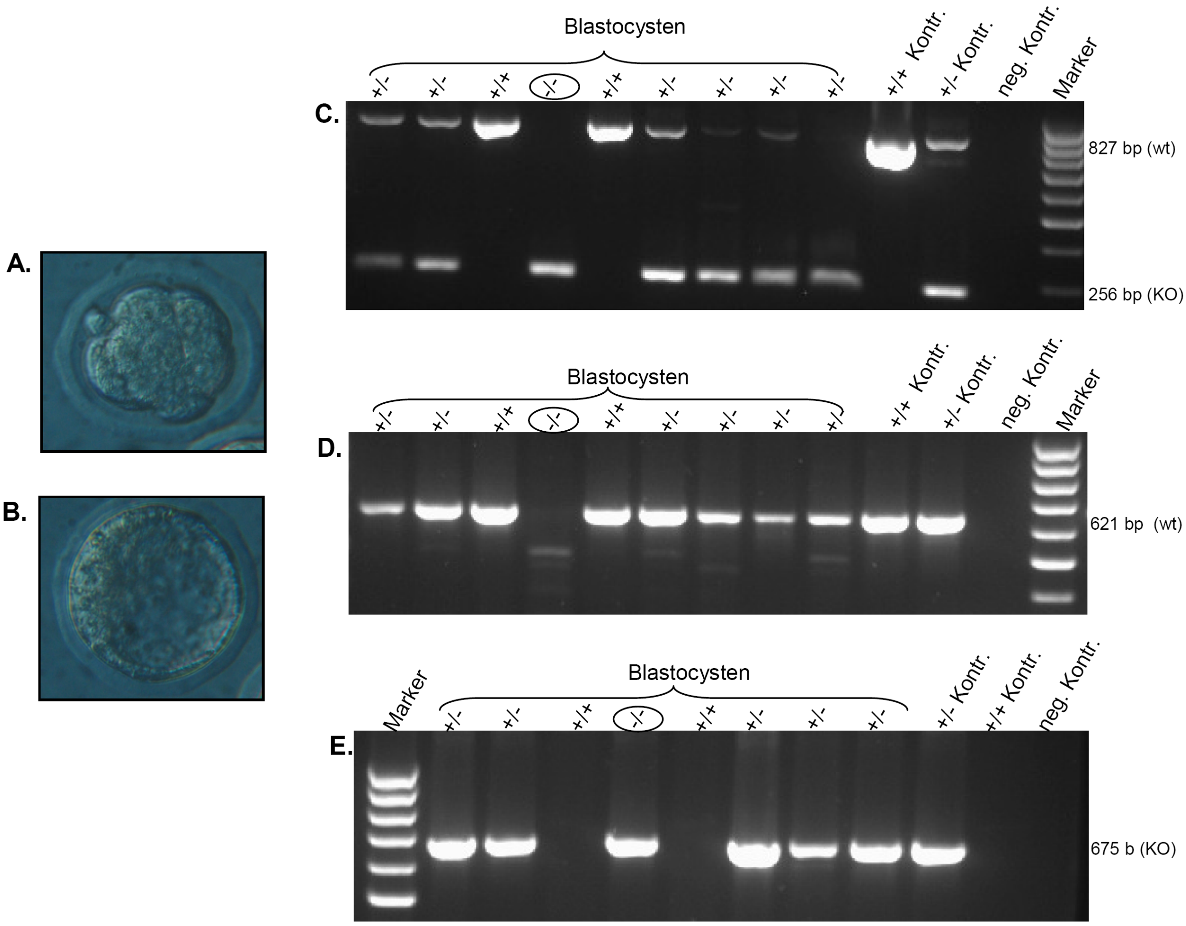
<u>Abbildung 3.18:</u> Analysen von Embryonen des Entwicklungsstadiums E12.5;
A. Foto eines Embryos an E12.5-*Sfrs10*$^{+/-}$; **B.** Auf einem Agarose-Gel separierte PCR-Produkte zur Identifizierung des deletierten Allels. Als Matrize diente Schwanzspitzen-DNA, welche mit den Primern 3482/3487 amplifiziert wurde. Bei heterozygoten Embryonen sind sowohl die wildtypische Fragmentbande (852 bp) als auch die KO-Bande (290 bp) zu erkennen.



<u>Abbildung 3.19:</u> Analysen von Embryonen des Entwicklungsstadiums E10.5;
A. Foto eines Embryos an E10.5 *Sfrs10*$^{+/+}$; **B.** Auf einem Agarose-Gel separierte PCR-Produkte zur Identifizierung des deletierten Allels. Als Matrize diente embryonale DNA, welche mit den Primern 2507/2618 amplifiziert wurde. Bei heterozygoten Embryonen sind sowohl die wildtypische Fragmentbande (936 bp), als auch die KO-Bande (380 bp) zu erkennen.

Da *Sfrs10* im adulten Tier ubiquitär exprimiert wird und somit auch ein sehr früher Zeitpunkt der Letalität nicht auszuschließen war, wurden Morulae (E2.5) und Blastulae (E3.5) präpariert und genotypisiert (Abbildung 3.20) (2.10.6.1). Zunächst wurden zwei Präparationen von Morulae durchgeführt und diese über Nacht bei 37°C in M2-Medium inkubiert. Bei diesen Versuchen entwickelten sich alle isolierten Morulae zu Blastocysten, so dass in weiteren Experimenten unmittelbar Blastocysten isoliert wurden. Die *in vitro*-differenzierten und die isolierten Blastocysten (2.10.6.1) wurden nach Amplifikation der DNA (2.7.8) genotypisiert. Die Genotypisierung erfolgte hierbei nicht nur mit einer PCR, sondern wurde mit zwei weiteren verifiziert – eine dieser PCRs war spezifisch für das wt-Allel, die andere für das *knock-out*-Allel (siehe Abbildung 3.13A). Mittels Kombination der Ergebnisse dieser PCRs ließen sich eindeu-

tige Rückschlüsse auf den Genotyp der Embryonen ziehen. Für dieses frühe Stadium der Entwicklung waren definitiv noch *Sfrs10*$^{-/-}$-Embryonen detektierbar, welche sich in ihrem Entwicklungsgrad nicht von heterozygoten oder wildtypischen Blastocysten unterschieden. Abbildung 3.20 zeigt die Ergebnisse einer der Analysen von E3.5. Tabelle 3.4 gibt eine Übersicht der präparierten Embryonen an E3.5 und der bestimmten Genotypen.



<u>Abbildung 3.20:</u> Analysen von Morulae und Blastulae; A. Fotos einer Morula (E2.5) und **B**. einer Blastula (E3.5); C-F: Auf einem Agarose-Gel separierte Produkte verschiedener Typisierungs-PCRs von „*Sfrs10*“-Blastocysten. Die Genotypen sind angedeutet. Die Blastocysten-DNA wurde vor den Typisierungs-PCRs amplifiziert. Der *Sfrs10*$^{-/-}$-Embryo ist markiert. **C.** PCR (Primer: 2507/3263) zur Amplifikation des wt- (827 bp), als auch der KO-Fragments (256 bp); **D:** PCR (Primer: 2339/2340) zur Amplifikation des wt-Fragments (621 bp); **E.** PCR (Primer: 3101/3240) zur Amplifikation des KO-Fragments (675 bp).

Um den Zeitraum der Letalität für *Sfrs10*$^{-/-}$-Embryonen zwischen E3.5 und E10.5 weiter eingrenzen zu können, wurden Embryonen weiterer Entwicklungsstadien präpariert (2.10.6) und analysiert. Schließlich konnten an Tag E9.5 homozygote *knock-out*-Embryonen präpariert und mit PCR-Genotypisierungen verifiziert werden (Abbildung 3.21). Diese wiesen im Vergleich mit ihren wildtypischen oder heterozygoten Geschwistern eine starke Entwicklungsretardierung

auf und zeigten bereits erste Resorptionsanzeichen, so dass von einem früheren Todeszeitpunkt ausgegangen werden musste. So war z.B. bei dem homozygoten *Sfrs10-knock-out*-Embryo E5 (Abbildung 3.21) noch die Allantois zu erkennen, während Geschwister der anderen Genotypen bereits die Nabelschnur ausgebildet hatten (Abbildung 3.21). Die Allantois fusioniert an Tag ~E8 mit dem Chorion und bildet die Nabelschnur. Ferner konnten bei keinem der homozygoten *knock-out*-Embryonen Anzeichen für eine Durchblutung festgestellt werden. Sie wiesen alle eine weißlich-blasse Farbe auf, während bei Geschwistern der anderen Genotypen bereits deutliche Färbungen zu erkennen waren (Abbildung 3.21). Leichte Entwicklungsunterschiede zwischen Geschwistern einer Präparation konnten beobachtet werden, korrelierten jedoch nicht mit dem *Sfrs10*$^{+/-}$- oder *Sfrs10*$^{+/+}$-Genotyp.

Bei weiteren Embryonalpräparationen an Tag E8.5 konnten ebenfalls homozygote *knock-out*-Embryonen identifiziert werden. Auch diese *Sfrs10*$^{-/-}$-Embryonen zeigten bereits Entwicklungsretardierungen und eine beginnende Resorbierung (Abbildung 3.22). Geschwister mit dem *Sfrs10*$^{+/-}$- oder *Sfrs10*$^{+/+}$-Genotyp wiesen untereinander leichte Entwicklungsunterschiede auf, welche jedoch – wie bei den untersuchten E9.5 – nicht mit den Genotypen korrelierten.

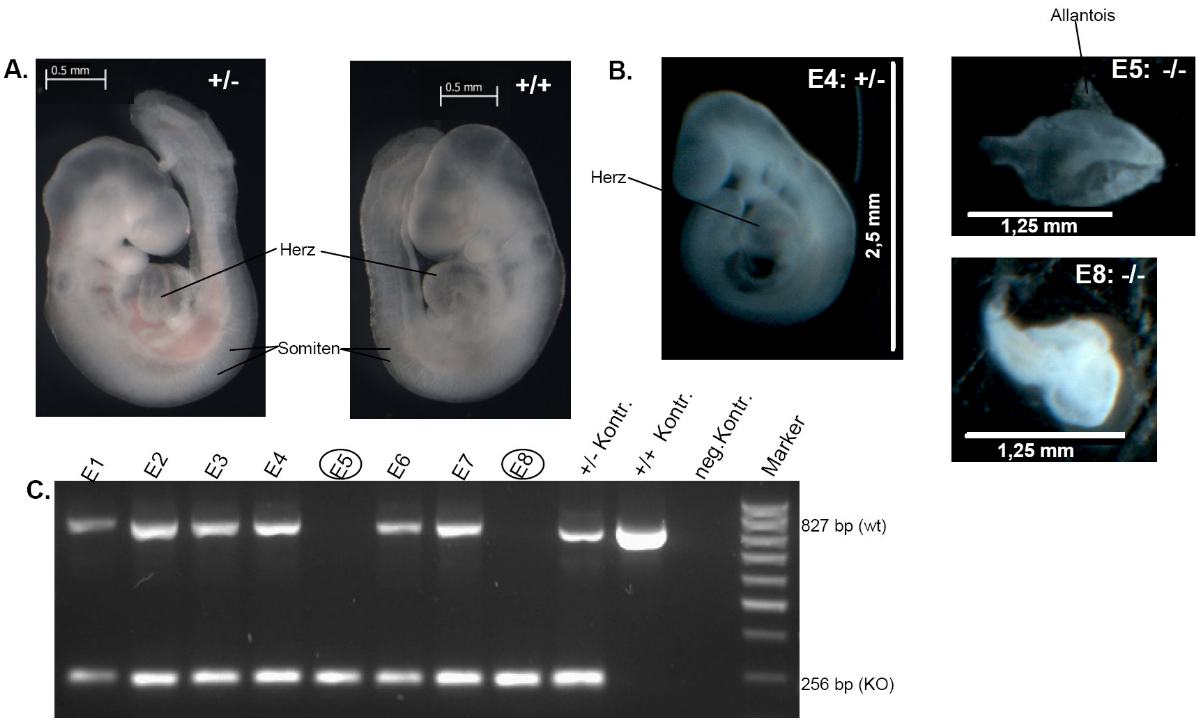
Abbildung 3.22 zeigt beispielsweise einen *Sfrs10*$^{+/-}$- und einen *Sfrs10*$^{+/+}$-Embryo, von welchen der Embryo E3 den Drehprozess schon vollzogen hat und Embryo E8 sich im Drehprozess befindet. Die Drehung des Embryos vollzieht sich bei Vorliegen von 6-8 Somitenpaaren zwischen Tag E8-E8.5.

In weiteren Analysen von E7.5-Embryonen konnten, nach Amplifikation der embryonalen DNA (2.7.8) und Genotypisierung mit drei unabhängigen PCRs, ebenfalls *Sfrs10*$^{-/-}$-Embryonen nachgewiesen werden (Abbildung 3.23). Da bei den Präparationen kein augenscheinlicher Entwicklungsunterschied zwischen *Sfrs10*$^{-/-}$- und *Sfrs10*$^{+/-}$- oder *Sfrs10*$^{+/+}$-Embryonen ausgemacht werden konnte, wurde geschlossen, dass der homozygote Verlust von *Sfrs10* zwischen Tag 7.5 und 8.25 der Embryonalentwicklung zur Letalität führt.

Tabelle 3.4 gibt eine Übersicht der präparierten Embryonen verschiedener Entwicklungsstadien und der Genotypisierungsergebnisse zur Bestimmung des Zeitpunkts der Letalität von *Sfrs10*$^{-/-}$-Embryonen.

Tabelle 3.4: Übersicht der präparierten Embryonen verschiedener Entwicklungsstadien zur Untersuchung des letalen Phänotyps des *Sfrs10-knock-outs*

Embryonalstadium	Würfe/ Präparationen	Anzahl der untersuchte Embryonen:	*Sfrs10*$^{+/+}$ (wt)	*Sfrs10*$^{+/-}$ (het. KO)	*Sfrs10*$^{-/-}$ (hom. KO)	resorbiert
E3.5	5x	68	11 (16,2%)	40 (58,8%)	17 (25%)	0
E7.5	1x	6	0	4	2	0
E8.5	2x	16	6	6	4	4 = -/-
E9.5	6x	37	7 (18,9%)	23 (62,2%)	4	7 = 4x-/- (18,9%)
E10.5	5x	37	7	4	0	13
E12.5	4x	22	5	10	0	7



<u>Abbildung 3.21:</u> Analysen von Embryonen des Entwicklungsstadiums E9.5. Die Größenbalken markieren 0,5, 1,25 oder 2,5 mm. **A.** Fotos eines *Sfrs10*$^{+/-}$- und eines *Sfrs10*$^{+/+}$-Embryos an E9.5. Es sind bereits deutlich Herz und Somiten zu erkennen. **B.** Fotos dreier Embryonen an Tag 9.5. Die beiden *Sfrs10*$^{-/-}$-Embryonen (E5 und E8) zeigen eine deutliche Entwicklungsretardierung im Vergleich mit dem *Sfrs10*$^{+/-}$-Embryo (E4) der gleichen Präparation. Bei E5 (*Sfrs10*$^{-/-}$) ist noch die Allantois zu erkennen, während bei Geschwistern anderer Genotypen bereits die Nabelschnur ausgebildet ist (mit der Präparation entfernt). **C.** Typisierungs-PCR (Primer: 2507/3263) der in B. gezeigten Embryonen. Es wurden folgende Fragmente amplifiziert: wt = 827 bp; KO = 256 bp. Die Embryonen E5 und E8 tragen die Deletion des *Sfrs10* homozygot.

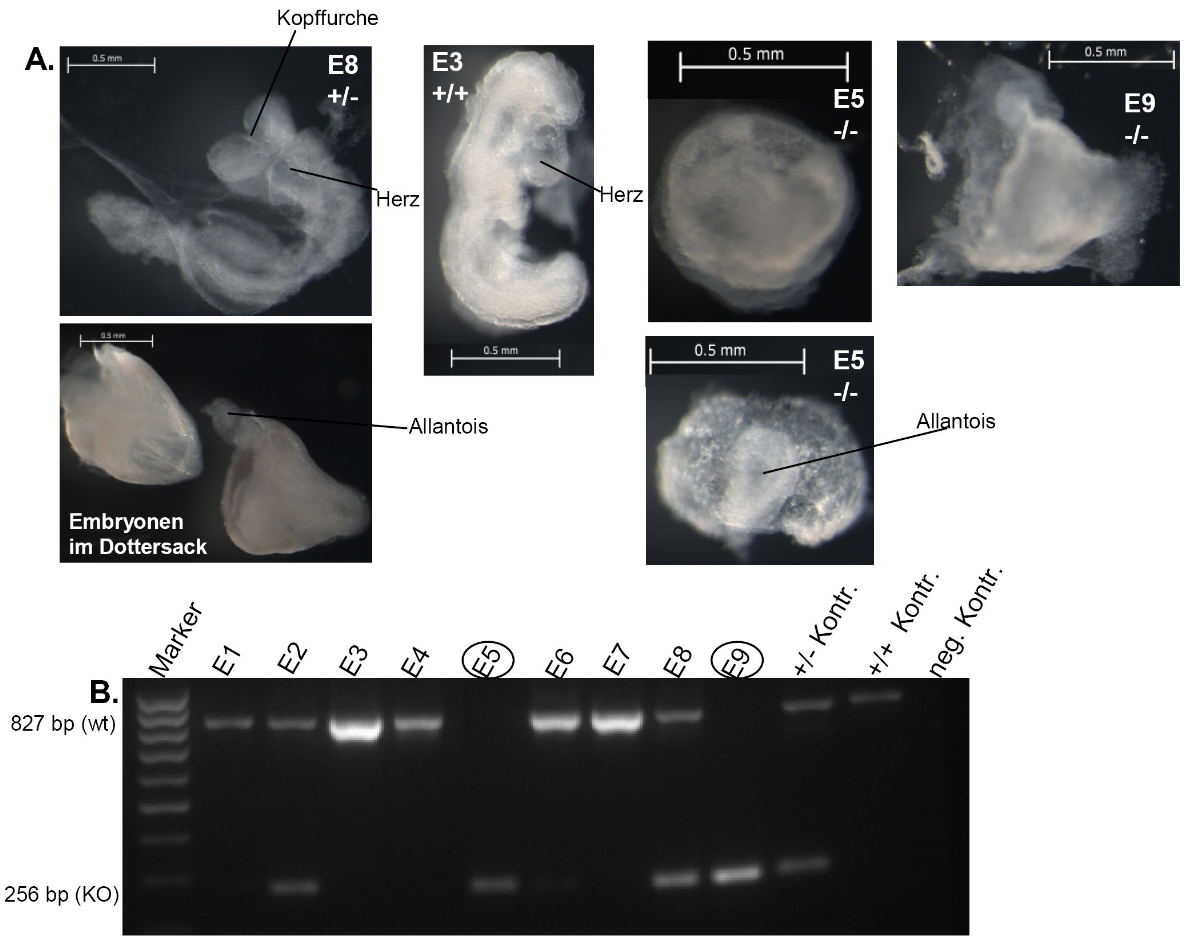


Abbildung 3.22: Analysen von Embryonen des Entwicklungsstadiums E8.5. Die Größenbalken markieren jeweils 0,5 mm. **A**. Fotos von Embryonen an Tag 8.5. Von links nach rechts: heterozygoter *Sfrs10-knock-out*-Embryo im Drehprozess (oben), Embryonen im Dottersack (unten), gedrehter wt-Embryo, homozygoter *Sfrs10-knock-out*-Embryo im Dottersack (oben), ohne Dottersack (unten) und homozygoter *Sfrs10-knock-out*-Embryo. E5 und E9 zeigen eine starke Entwicklungsretardierung im Vergleich mit Embryonen der gleichen Präparation. **B**.Typisierungs-PCR (Primer: 2507/3263) der in A. gezeigten Embryonen. Es wurden folgende Fragmente amplifiziert: wt = 827 bp; KO = 256 bp. Die Embryonen E5 und E9 tragen die Deletion des *Sfrs10* homozygot.

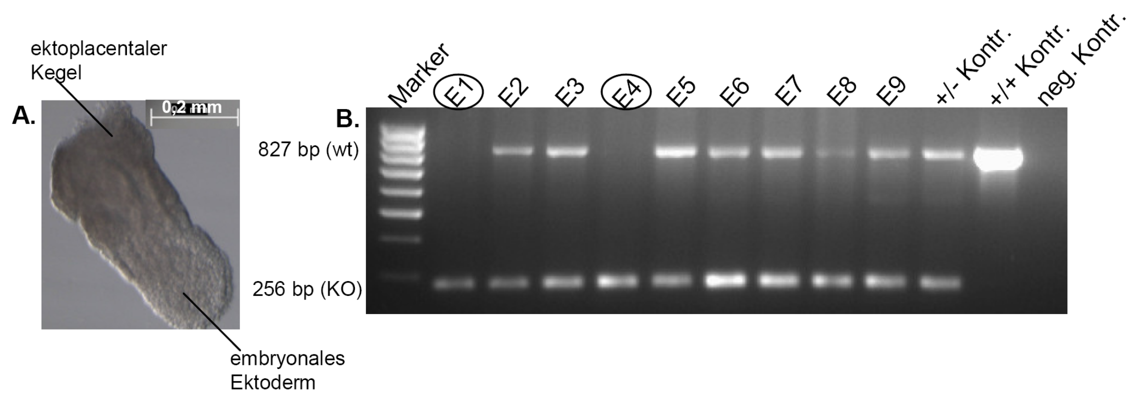
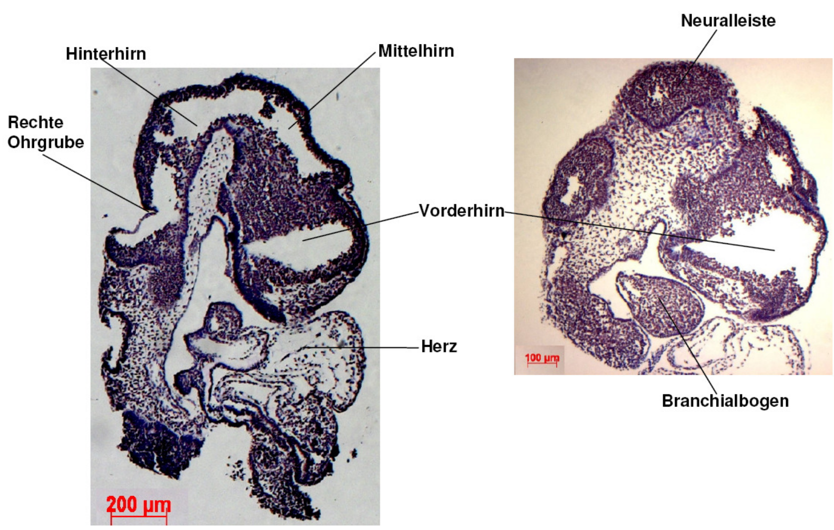


Abbildung 3.23: Analysen von Embryonen des Entwicklungsstadiums E7.5. Der Größenbalken markiert 0,2 mm. **A.** Foto eines *Sfrs10*$^{+/-}$-Embryonen an E7.5. **B.** Typisierungs-PCR (Primer: 2507/3263) von Embryonen an Tag 7.5. Es wurden folgende Fragmente amplifiziert: wt = 827 bp; KO = 256 bp. Die Embryonen E1 und E4 tragen die Deletion des *Sfrs10* homozygot.

3.4.3.2 Immunhistologische Analysen zur Bestimmung des Zeitpunkts der Letalität von *Sfrs10*$^{-/-}$-Embryonen

Die vorausgegangenen präparativen Analysen und deren Auswertung (3.4.3.1) ergaben, dass der *Sfrs10*$^{-/-}$-Genotyp infolge von Entwicklungsretardierungen zur embryonalen Letalität zwischen Tag E7 und E8 führte. Eine genaue Ursache sollte mit weitergehenden immunhistologischen Analysen (2.8.6) geklärt werden. *Sfrs10* wird im adulten Tier ubiquitär exprimiert (Segade et al. 1996) (Evrim Anadol, Doktorarbeit). Über das Expressionsmuster während der Embryonalentwicklung bestanden nur Kenntnisse an späteren Stadien (E15), wobei das Protein auch in diesen ubiquitär exprimiert wird (Chen et al. 2004a). Daher sollten immunhistologische Färbungen von Sfrs10 zu verschiedenen Zeitpunkten der Embryonalentwicklung durchgeführt werden. Anhand des Expressionsmusters sollten Rückschlüsse auf die Sfrs10-Funktion während spezifischer Stadien der Embryonalentwicklung und somit auch auf die Ursache der Letalität von *Sfrs10*$^{-/-}$-Embryonen gezogen werden. Dazu wurden aus *Sfrs10*$^{+/-}$-Interkreuzungen-resultierende Embryonen in unterschiedlichen Entwicklungsphasen präpariert. Zunächst wurde hierbei ein 9.5 Tage alter Embryo gefärbt, wobei bereits in diesem Stadium der Embryonalentwicklung eine ubiquitäre Expression des Sfrs10-Proteins festzustellen war. Diese Färbungen schienen besonders kräftig in Gehirnregionen und etwas weniger ausgeprägt im Herzbereich zu sein (Abbildung 3.24).



<u>Abbildung 3.24:</u> Expression von Sfrs10 an E9.5; Paraffinschnitte eines wildtypischen Embryos an Tag 9.5 mit Sfrs10-Färbung. Das Protein wird ubiquitär exprimiert – mit besonders starker Expression in neuronalen Bereichen. Die Balken markieren 200 bzw. 100 µm.

Für weitere Untersuchungen wurden auch Embryonen früherer Entwicklungsstadien auf die Expression des Sfrs10 untersucht. Da bei den Präparationen des Embryos an E9.5 bereits wegen der Aufbereitung in Paraffin und mit der Färbung Strukturen zerstört worden waren, wurden jüngere Embryonen nicht wie bei den präparativen Analysen (3.4.3.1) aus dem Decidua präpariert, sondern in diesem belassen. Die Deciduen wurden fixiert, in Paraffin eingebettet, geschnitten und mit immunhistologischen Methoden analysiert. Bei Färbungen von Embryonen um Tag 8 ihrer Entwicklung zeigte sich bereits eine ubiquitäre Expression des Spleißfaktors (Abbildung 3.25). Mit Hilfe von Untersuchungen verschiedener Embryonen konnte ein Embryo identifiziert werden, der die Deletion des *Sfrs10* homozygot zu tragen schien. Der Embryo zeigte keine Sfrs10-Färbung und ließ sich nur über die Gegenfärbung mit GIEMSA abgrenzen. Die mangelnde embryonale Sfrs10-Färbung wurde besonders mit den Sfrs10-positiven Zellen des umgebenden maternalen placentalen Gewebes der für *Sfrs10* heterozygoten Mutter deutlich. Wegen der Schnitttiefe waren bei den untersuchten sagittalen Schnitten insbesondere extraembryonale Strukturen zu erkennen. Im Vergleich mit einem Sfrs10-positiven Embryo fielen hierbei keine deutlichen Fehlbildungen auf. Der *Sfrs10*$^{-/-}$-Embryo zeigte jedoch keine Anzeichen für die Bildung von Blutzellen, während diese bei einem Sfrs10-positiven Embryo zu detektieren waren (Abbildung 3.25).

Weitere Analysen mit Sfrs10-Färbungen an Embryonen um Tag 7 deuteten bereits für dieses frühe Stadium der Entwicklung eine ubiquitäre nucleäre Expression des Spleißfaktors an (Abbildung 3.26).

Im Verlauf dieser Arbeit wurden die Datenbanken ergänzt. Laut dieser Informationen scheint Sfrs10 bereits ab dem sechsten Tag der Embryonalentwicklung im extraembryonalen Ektoderm exprimiert zu werden (MGI; *Mouse genome informatics).*

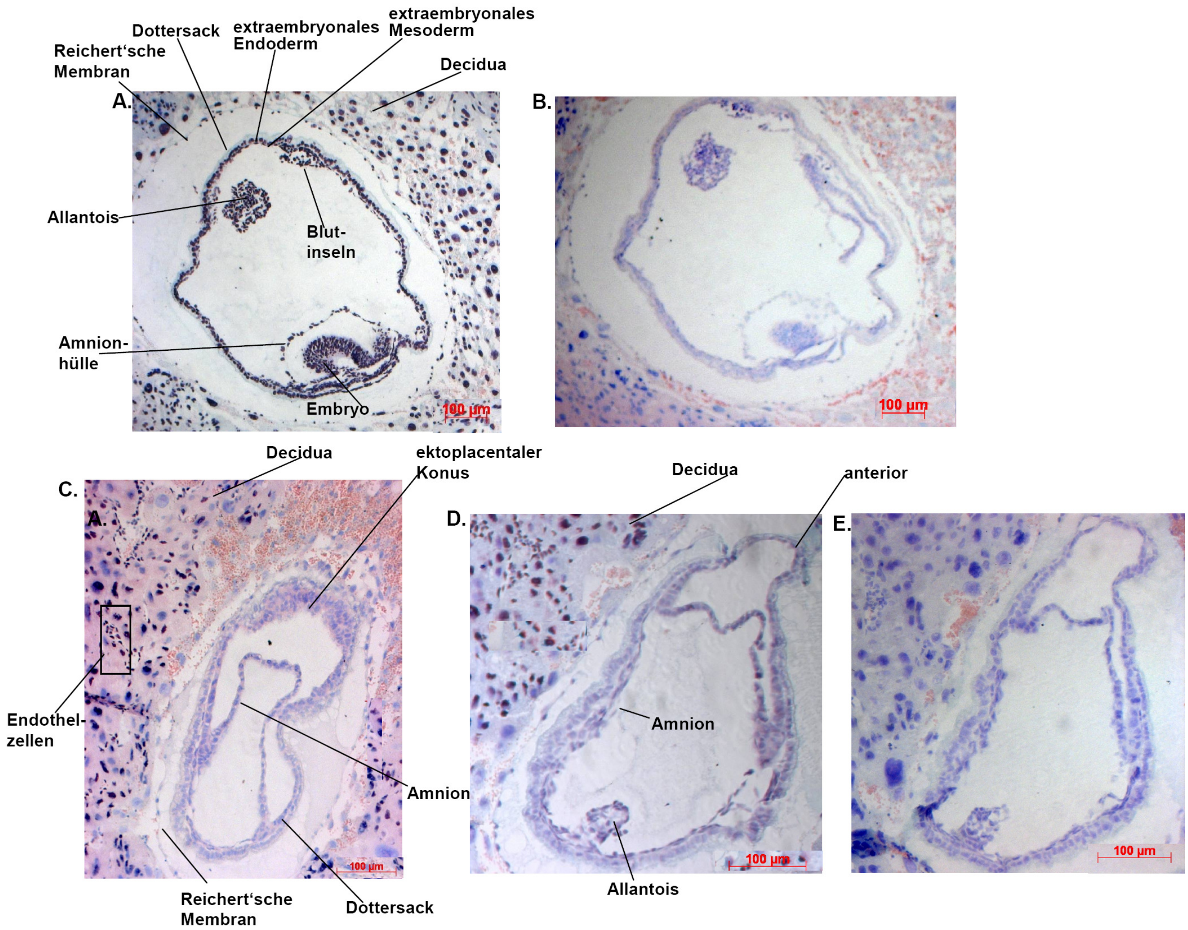


Abbildung 3.25: Expression von Sfrs10 um E8-8.5; das Protein wird ubiquitär exprimiert. **A**. Embryo mit Sfrs10- und GIEMSA-Färbung. **B**. Embryo mit GIEMSA-Färbung**. C**. und **D.** Der *Sfrs10-knock-out*-Embryo weist nur die GIEMSA- jedoch keine Sfrs10-Färbung auf. Im benachbarten maternalen Gewebe ist die Sfrs10-Färbung deutlich zu erkennen. Im maternalen Gewebe sind Endothelzellen, also eine intakte Vaskularisierung zu beobachten. **E.** Nur GIEMSA-Färbung. Die Balken markieren jeweils100 µm.

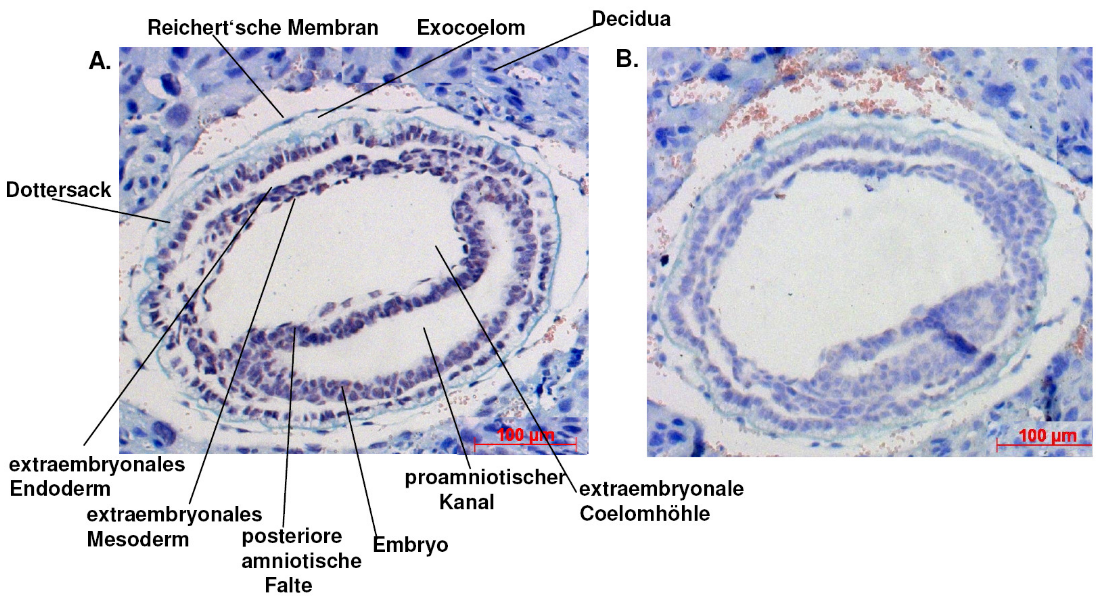


Abbildung 3.26: Expression von Sfrs10 um E7; das Protein wird ubiquitär exprimiert. **A.** Embryo mit Sfrs10- und GIEMSA-Färbung im Querschnitt; **B**. nur GIEMSA-Färbung. Die Balken markieren jeweils 100 µm.

3.5 Generierung und Analysen spezifischer *Sfrs10-knock-outs*

Die phänotypischen Analysen des homozygoten *knock-outs* von *Sfrs10*, welcher zu der embryonalen Letalität führt (3.4), verdeutlichen die wichtige Funktion von Sfrs10 in *Mammalia.* Der frühe letale Phänotyp des ubiquitären *Sfrs10-knock-outs* schloss weitergehende Funktionsanalysen des Spleißfaktors an diesen Embryonen aus, so dass auf die spezifische konditionale Deletion des Gens ausgewichen wurde.

3.5.1 Generierung der homozygot-gefloxten *Sfrs10*-Linie

Mit der Anwendung einer adäquaten *targeting*-Strategie für das *Sfrs10*-Gen (3.2.2) waren neben der ubiquitären Deletion auch spezifische konditionale Deletionen unter Verwendung entsprechender Cre-Linien möglich. Die Ursprungslinie *Sfrs10*$^{FLneo/+}$ jeglicher generierter *Sfrs10*-Linien trug wegen der Elemente des verwendeten *targeting*-Konstruktes noch die *Neo*-Kassette. Diese diente der einstigen Selektion von ES-Zellen. Das Resistenzgen war von FRT-Stellen flankiert, so dass die Flp-Rekombinase-induzierte Deletion ermöglicht wurde. Für die Generierung spezifischer konditionaler *Sfrs10-knock-outs* war die Deletion der *Neomycin*-Kassette (2 kb) von Bedeutung, da deren Insertion mitten im *Sfrs10* die normale Genfunktion hätte beeinflussen können. Wegen des starken *Neo*-Promotors hätten zudem benachbarte Gene beeinträchtigt werden können. Auf eine *in vitro*-Deletion der *Neo*-Kassette in homolog-rekombinanten ES-Zellen vor der Injektion wurde bewusst verzichtet, um infolge erneuter Modifikationen der Zellen die Wahrscheinlichkeit einer Keimbahntransmission nicht zu vermindern. In der *Sfrs10*$^{FL/FL}$-Linie, die als Ausgangslinie für spezifische konditionale *Sfrs10-knock-outs* diente, musste die normale Sfrs10-Funktion jedoch erhalten bleiben, um später ausschließlich in den entsprechend gewünschten Geweben einen determinierten *knock-out* des Gens zu erzielen. In dieser Linie sollten also die loxP-Elemente, welche die KO-Region flankierten, die einzige genetische Modifikation im Vergleich mit wildtypischen Mäusen sein. Die Tatsache, dass – wie auch für den ubiquitären *knock-out* von *Sfrs10* – bei Interkreuzugen von *Sfrs10*$^{FLneo/+}$-Tieren keine homozygoten *FLneo*-Nachkommen detektiert wurden (Tabelle 3.4), unterstreicht die Bedeutsamkeit des Sfrs10 während der Embryonalentwicklung (vgl. 3.4.3). Diese Ergebnisse deuten zudem die Relevanz der *in vivo-Neo*-Deletion für die Funktionalität des *Sfrs10* an. Dies erfolgte mit Kreuzungen der *Sfrs10*$^{FLneo/+}$-Linie mit einer transgenen *Flp*-Rekombinase-Linie (Rodriguez et al. 2000). Mit der in Abbildung 3.27A dargestellten PCR-Strategie wurden *Sfrs10*$^{FL/+}$-Nachkommen von wildtypischen oder *Sfrs10*$^{FLneo/+}$-Geschwistern selektiert. Bei *Sfrs10*$^{FLneo/+}$-Tieren wurde bei den Analysen kein Fragment amplifiziert. Ein zusätzlicher PCR-Test diente der Detektion des *Flp*-Transgens (siehe Tabelle 2.4). Da die Re-

kombinase nicht in allen Geweben gleich effizient deletiert, letztlich aber die Deletion in allen Geweben induziert, wurden die Genotypisierungen mit einer weiteren – für den *FLneo*-Genotyp-spezifischen (vgl. 3.2.6) – PCR vervollständigt. Trugen $Sfrs10^{FLneo/+}$-Nachkommen das *Flp*-Transgen, wurde auch deren Genotyp als $Sfrs10^{FL/+}$ eingestuft. Die heterozygot gefloxten Nachkommen der geschilderten Kreuzungen, deren Genotyp mit *Southern*-Analysen verifiziert wurde, wurden weiter verpaart, so dass schließlich eine für das *Sfrs10* homozygot-gefloxte Linie ohne das *Flp*-Transgen generiert wurde. Diese $Sfrs10^{FL/FL}$-Linie (vgl. auch Abbildung 3.38) besteht weiterhin über Erhaltungszuchten als Ausgangslinie für alle spezifischen-konditionalen *Sfrs10*-*knock-outs*. Abbildung 3.27A zeigt die Strategie zur Identifizierung des gefloxten Allels mit PCR- und *Southern*-Analysen. Abbildung 3.27B und C zeigen die Ergebnisse dieser Analysen.

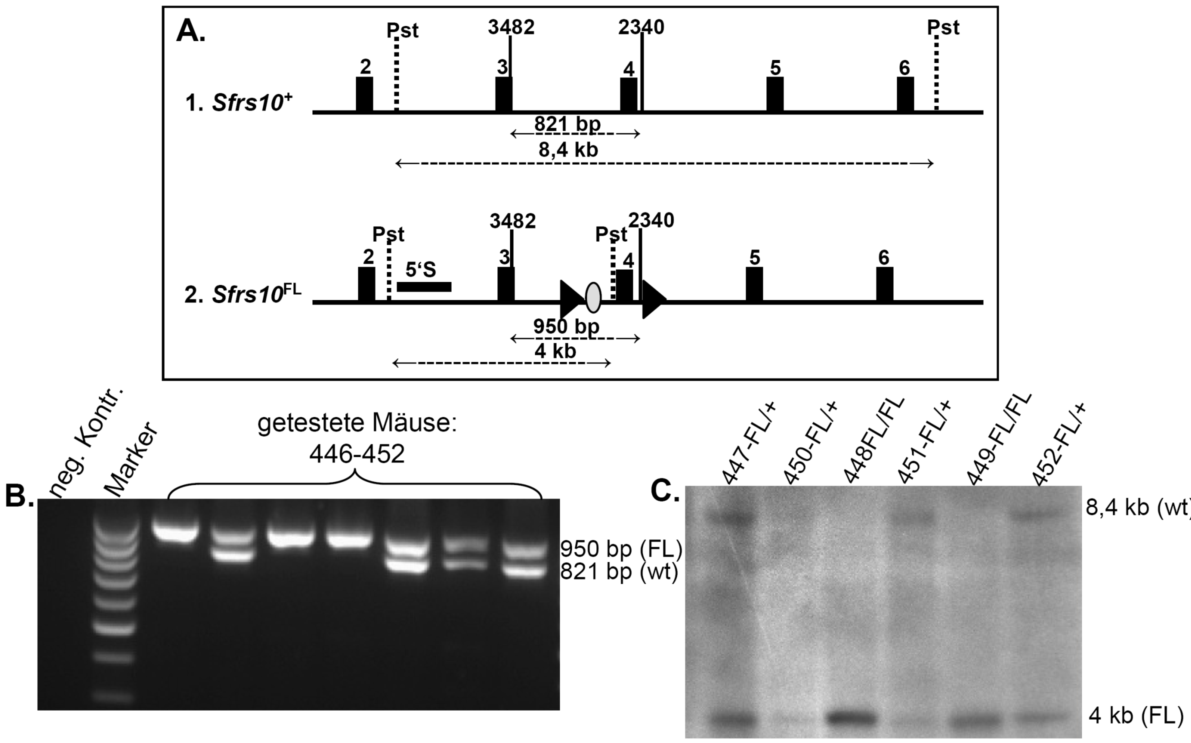


Abbildung 3.27: Identifizierung des gefloxten *Sfrs10*-Allels.
A. PCR- und *Southern*-Strategie zur Identifizierung und Verifizierung des gefloxten *Sfrs10*. PCR-Primer (Linien), Restriktionsschnittstellen (gestrichelte Linien) und resultierende Fragmente sind angedeutet.1. wt-Allel, 2. gefloxtes Allel. **B.** Auf einem Agarose-Gel separierte PCR-Produkte zur Identifizierung des gefloxten Allels. Als Matrize diente Schwanzspitzen-DNA, welche mit den Primern 3482/2340 amplifiziert wurde. Bei heterozygoten Tieren ist sowohl die wildtypische Fragmentbande (821 bp) als auch die „gefloxte"Bande (950 bp) zu erkennen. **C.** Autoradiographie eines *Southern Blots* zur Verifizierung des gefloxten *Sfrs10*-Allels. Schwanzspitzen-DNA wurde mit Pst I fragmentiert und nach Transfer mit der 5'-Sonde hybridisiert.

3.5.2 Generierung eines Motoneuronen-spezifischen *knock-outs* des *Sfrs10*

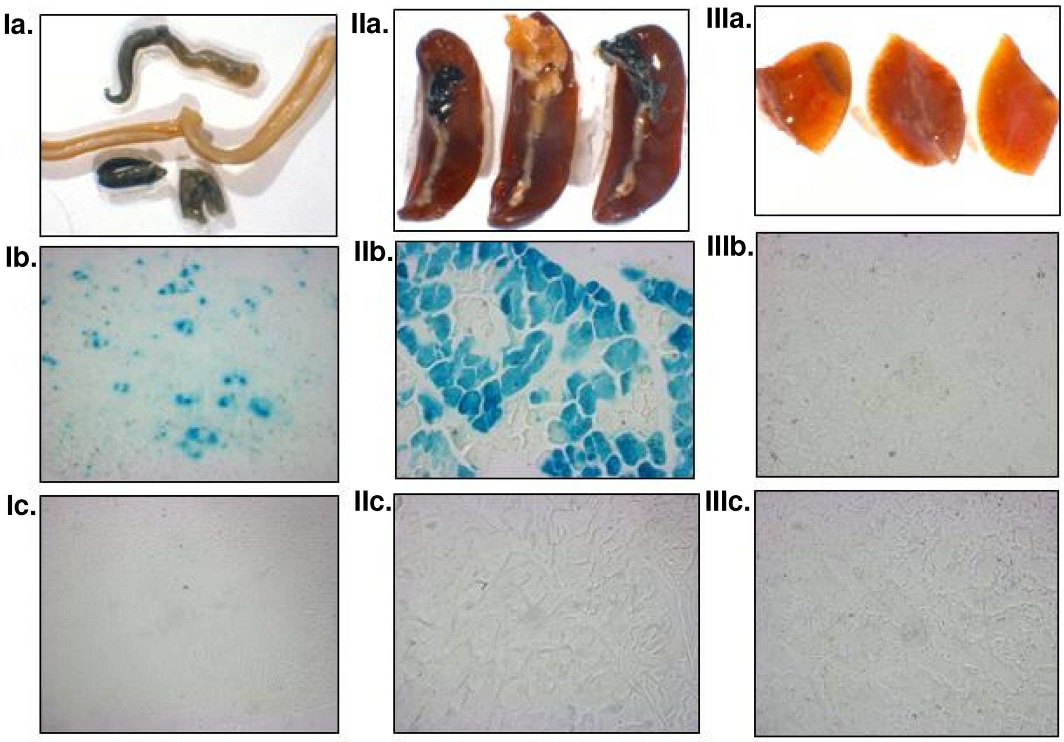
Die Ergebnisse der Analysen des ubiquitären *Sfrs10-knock-outs* (3.4.3) deuteten auf eine maßgebliche Funktion des Spleißfaktors in *Mammalia* während der Embryonalentwicklung hin. Auch in verschiedenen Arbeiten an *in vitro*-Systemen wurde die bedeutende Funktion des Sfrs10 bzw. SFRS10 an alternativen Spleißprozessen gezeigt (siehe 1.4.3). Da SFRS10 bei Überexpression *in vitro* einen erheblichen Einfluss auf das *SMN2*-Spleißen hat (Hofmann et al. 2000), sollte im Rahmen dieser Arbeit die Korrelation von Sfrs10 und *Smn* an einem *in vivo*-System untersucht werden. Für die SMA liegen mittlerweile zahlreiche adäquate Mausmodelle und deren Untersuchungen vor (vgl. 1.5.5) (Cifuentes-Diaz et al. 2001; Frugier et al. 2000; Hsieh-Li et al. 2000; Monani et al. 2000). Aus diesen lässt sich vermuten, dass bei einem Involvieren von Sfrs10 am *Smn*-Spleißen im Fall eines *Sfrs10-knock-outs* in neuronalen Zellen ein neuromotorischen Phänotyp auftreten könnte. Um die Aussage dieser Hypothese zu überprüfen, wurde ein konditionaler *Sfrs10-knock-out* in Motoneuronen – den bei der SMA primär betroffenen Zellen – generiert werden. Zur Generierung dieses konditionalen Mausmodells wurden *Sfrs10*$^{FL/FL}$-Tiere mit *Hb9-Cre*-Mäusen (Arber et al. 1999) verpaart. Diese transgene Linie exprimiert die *Cre*-Rekombinase unter Kontrolle des spezifischen *Hb9*-Promotors, so dass insbesondere in Motoneuronen die Deletion eines gefloxten Allels herbeigeführt wird. Hierbei beginnt die *Cre*-Expression im Stadium E9-E9.5, wenn sich die ersten Motoneuronen differenzieren. *Hb9* codiert einen Transkriptionsfaktor mit Homeodomäne. Dieser bindet an sogenannte Homeobox-Gene, deren Expression entwicklungsabhängig gesteuert wird. In der Regel sind Homeobox-Transkriptionsfaktoren entscheidende Elemente bei der Aktivierung von Genkaskaden. Hb9 wird auch in Teilen dem sich entwickelnden Pankreas und später in β-Zellen exprimiert (Li et al. 1999). Um ein Expressionsprofil der Hb9-Cre zu erhalten, wurden zunächst *Hb9-Cre*-transgene Tiere mit einer Reporter-Linie verpaart.

3.5.2.1 Analysen der Cre-Expression mit einer *Rosa26/LacZ-Hb9*-Reporter-Linie

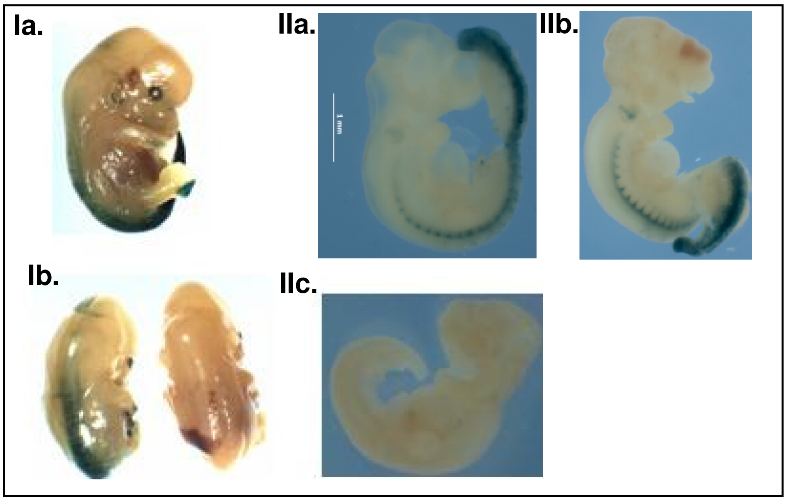
Die verwendete *Rosa26/LacZ*-Reporter-Linie (Soriano 1999) exprimiert das Transgen *ß-Galaktosidase* nur in Geweben, in denen auch die Cre-Rekombinase exprimiert wird, so dass sich mit immunhistologischen Methoden das Cre-Expressionsprofil einer *Cre*-transgenen-Linie verfolgen lässt. *Hb9-Cre*-transgene Tiere wurden mit Tieren der Reporter-Linie verpaart und die Genotypen der resultierenden Nachkommen mittels PCR bestimmt (vgl. Tabelle 2.4). Tiere, die sowohl das *Hb9-Cre*- als auch das *LacZ*-Transgen trugen, wurden für weitergehende Analysen verwendet. Hierbei wurden Organe entnommen und mittels immunhistologischer Methoden angefärbt (2.8.8) (Abbildung 3.28). Da die *Hb9*-Promotor-kontrollierte *Cre*-Expression an E9.5

beginnt, wurden alternativ Embryonen entsprechender Verpaarungen an Tag E10.5 oder E13.5 präpariert und gefärbt (Abbildung 3.29).

Abbildung 3.28 zeigt die Ergebnisse der Analysen verschiedener Organe adulter *Hb9-Cre; LacZtg*-Tiere im Vergleich mit *Hb9-Cre*-Kontrolltieren. Die blaue Färbung weist auf die Cre-Aktivität hin. Im Rückenmark (Ia/b) ist eine eindeutige Färbung zu erkennen; der Querschnitt zeigt eine deutliche Blaufärbung verschiedener neuronaler Zellen, wobei eine Färbung nicht ausschließlich auf Motoneuronen beschränkt ist, die sich wegen ihrer Größe von anderen neuronalen Zellen unterscheiden lassen. Die Aktivität der Cre-Rekombinase konnte auch in Teilen des Pankreas (vgl. Abbildung 3.28IIa/b) nachgewiesen werden, während in der Leber – als Kontrollgewebe – keine Färbung und somit keine Cre-Aktivität festzustellen war (Abbildung 3.28IIIa/b). Abbildung 3.29 zeigt die Färbungen von Embryonen des Entwicklungsstadiums E13.5 und E10.5. An *Hb9-Cre; LacZtg*-Embryonen ist mit der deutlichen Färbung entlang des Rückenmarks das Cre-Expressionsprofil nachweisbar.



<u>Abbildung 3.28</u>: X-Gal-Färbungen verschiedener Organe zur Bestimmung der *Hb9-Cre*-Expression. **a.** ganze Organe; b. und c. Paraffinschnitte (40x); b. Gewebe der Reporter-Linie *LacZtg, Hb9-Cre*; **c.** Kontrollgewebe der *Hb9-Cre*-Linie; **I.** Rückenmark; **II.** Milz mit Pankreas; **III.** Leber.
Die blaue Färbung weist auf das *Hb9-Cre*-Expressionsprofil hin.

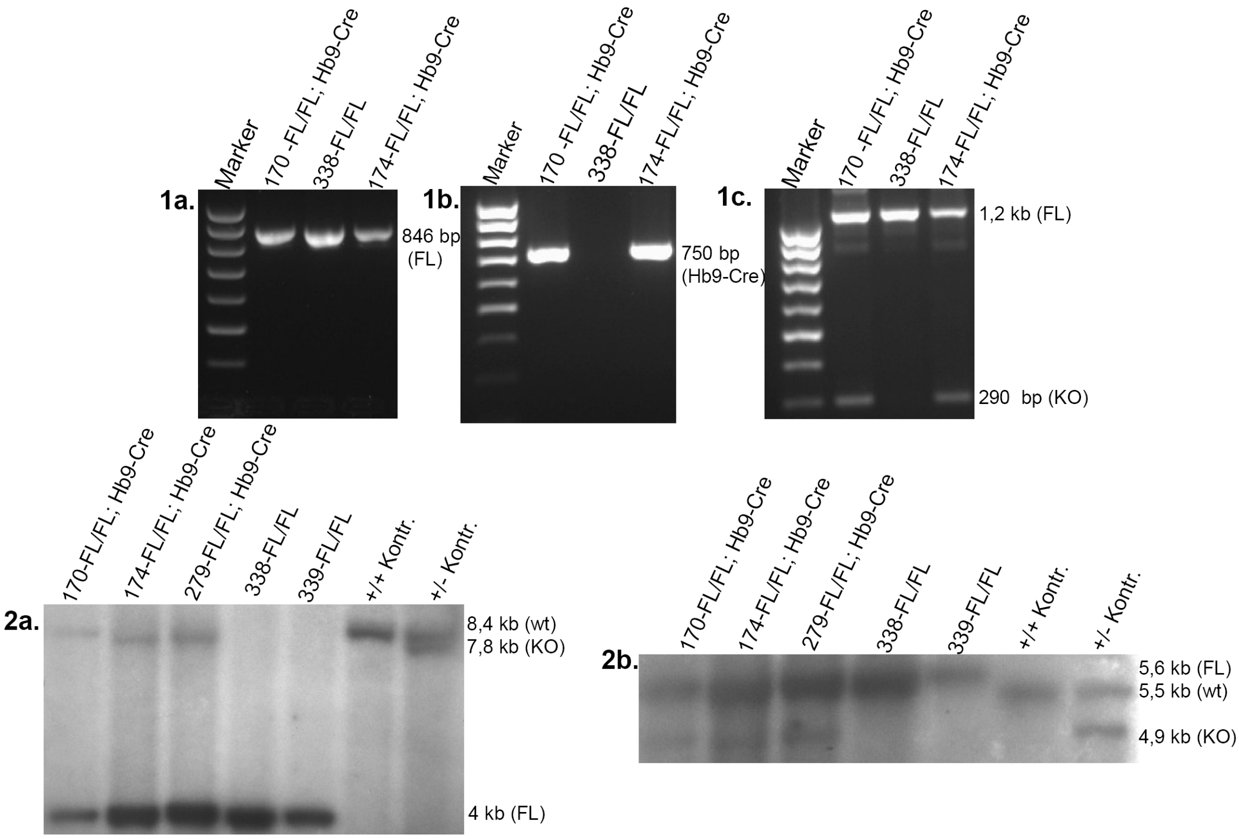


<u>Abbildung 3.29:</u> X-Gal-Färbungen von Embryonen an I. E13.5 und II. E10.5.
Ia. und **IIa/b**. *LacZtg/Hb9-Cre*-Reporter. **Ib**. *LacZtg/Hb9-Cre* im Vergleich mit einem *LacZtg*-Embryo der gleichen Präparation. **IIc.** *LacZtg*-Embryo der gleichen Präparation wie IIa/b. Der Balken in IIa. markiert 1 mm. Die blaue Färbung von *LacZtg/Hb9-Cre*-Embryonen weist auf das *Hb9-Cre*-Expressionsprofil hin.

3.5.2.2 Generierung und Identifizierung von *Sfrs10$^{FL/FL}$; Hb9-Cre*-Mäusen

Nachdem mit den immunhistologischen Analysen der Reporter-Linie das Expressionsprofil der *Hb9-Cre* verdeutlicht worden war, wurden schließlich über weitere Verpaarungen *Sfrs10$^{FL/FL}$; Hb9-Cre*-Tiere generiert. Das *Hb9-Cre*-Transgen wurde hierbei stets in heterozygotem Zustand belassen, da das Kreuzen auf Homozygotie dieses Transgens einem *Hb9-knock-out* gleichgekommen wäre. Diese Cre-Rekombinase liegt unter Kontrolle des *Hb9*-Promotors im endogenen *Hb9*-Locus vor, so dass dieser nicht funktionell ist (Arber et al. 1999). Die *Sfrs10$^{FL/FL}$; Hb9-Cre*-Tiere waren lebensfähig, fertil und wiesen keinen anomalen motorischen Phänotyp auf.
Der Genotyp dieser Tiere wurde mit der Kombination verschiedener PCRs bestimmt (vgl. Tabelle 2.4) und mittels *Southern*-Analysen verifiziert (Abbildung 3.30). Hierbei konnte über die Anwesenheit des homozygot-gefloxten *Sfrs10*-Allels (Abbildung 3.30-1a) und des *Hb9*-Transgens (Abbildung 3.30-1b) der Genotyp spezifiziert werden. Da eine Deletion in Motoneuronen induziert und die DNA aus Schwanzspitzenmaterial gewonnen wurde, konnte die Deletion des Gens bereits mit einer entsprechenden PCR gezeigt werden (Abbildung 3.30-1c), wobei das relativ schwache Signal auf den geringen Anteil von Motoneuronen im Biopsat zurückzuführen ist. Mit *Southern*-Analysen an Pankreas-DNA konnten die Ergebnisse verifiziert werden (vgl. Abbildung 3.13A und Abbildung 3.27A). Auch im Rahmen dieser Analysen wurde wegen

der Restriktion der *Hb9*-Expression auf Teile des Gewebes neben dem Signal für das gefloxte *Sfrs10* jenes für das deletierte *Sfrs10* detektiert (Abbildung 3.30-2a/b).



<u>Abbildung 3.30:</u> Genotypisierung von *Sfrs10$^{FL/FL}$; Hb9-Cre*-Mäusen. **1.** Auf einem Agarose-Gel separierte PCR-Produkte von Schwanzspitzen-DNA. **1a**. gefloxtes *Sfrs10*-Allel = FL (Primer: 2507/2340) = 846 bp; **1b.** *Hb9-Cre* (Primer: 3140/3141) = 750bp; **1c.** *Sfrs10*-Ex4-Deletion = KO (Primer: 3482/3487); FL = 1,2 kb; KO = 290 bp. **2.** Autoradiographien von *Southern Blots* zur Verifizierung des *Sfrs10$^{FL/FL}$; Hb9-Cre*-Genotyps unter Verwendung von Pankreas-DNA. **2a**. In *Sfrs10$^{FL/FL}$; Hb9-Cre*-Tieren lässt sich sowohl das gefloxte als auch das deletierte Allel nachweisen. Restriktion mit Pst I und Hybridisierung mit der 5'-Sonde. **2b**. Restriktion mit Nsi I und Hybridisierung mit der KO-Sonde. In *Hb9-Cre*-Tieren ist das *knock-out*-Signal detektierbar.

3.5.2.3 Immunhistologische Untersuchungen an *Sfrs10*$^{FL/FL}$*; Hb9-Cre*-Mäusen

Obwohl die *Sfrs10*-Deletion bei *Sfrs10*$^{FL/FL}$*; Hb9-Cre*-Tieren über Genotypisierungen gezeigt wurde, wiesen diese keinen auffälligen motorischen Phänotyp auf (3.5.2.2) auf. Immunhistologische Analysen an Material der entsprechenden Mäuse sollten Aufschluss über mögliche phänotypische Konsequenzen des *Sfrs10-knock-outs* in Motoneuronen geben. Zu diesem Zweck wurden zunächst Übersichtsfärbungen mit Kresylviolett (Nissl-Färbung, siehe 2.8.9) verschiedener Rückenmarkareale angefertigt. Hierbei konnten im Vergleich mit *Sfrs10*$^{FL/FL}$-Tieren keine Auffälligkeiten an *Sfrs10*$^{FL/FL}$*; Hb9-Cre*-Mäusen beobachtet werden (Abbildung 3.31).

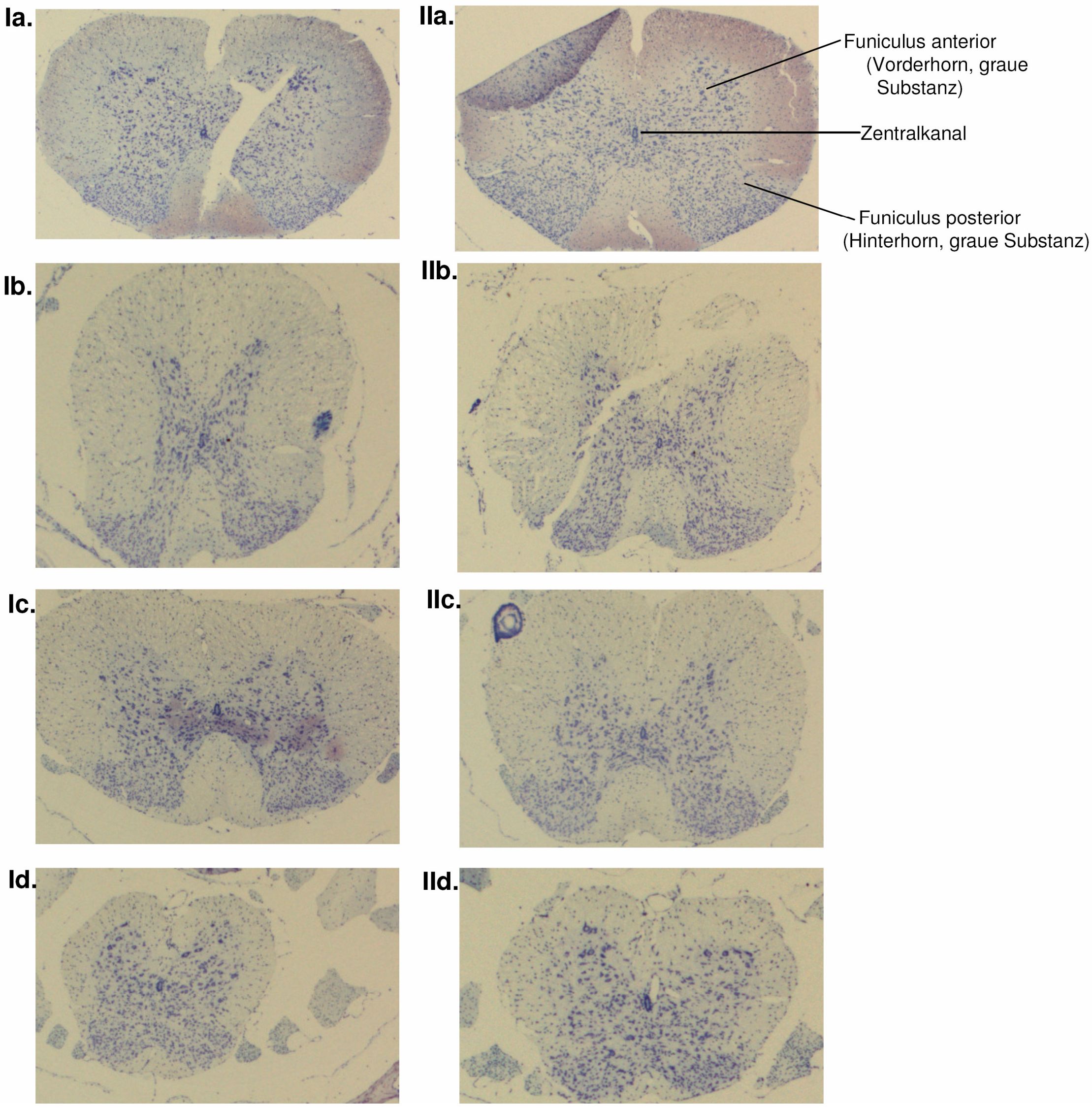
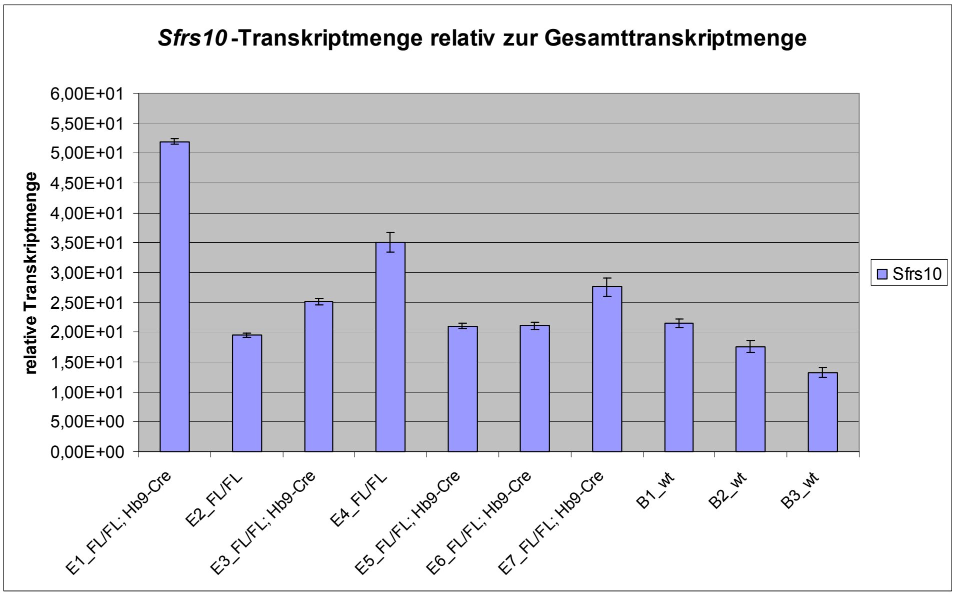


Abbildung 3.31: Nissl-Färbung verschiedener Rückenmarkareale im Querschnitt (**a.** cervikal, **b**. thorakal, **c**. lumbal, **d**. sakral) von *Sfrs10*$^{FL/FL}$-(**I**.) und *Sfrs10*$^{FL/FL}$*; Hb9-Cre*-Tieren (**II**.) im Alter von 18 Wochen. Es sind keine deutlichen Unterschiede zu erkennen.

3.5.2.4 Nachweis der *Sfrs10*-Deletion in Motoneuronen

Neben den Genotypisierungen auf DNA-Ebene (3.5.2.2) sollte die Deletion des *Sfrs10* auch auf der Expressionsebene nachgewiesen werden. Dies wurde mittels der *Realtime*-PCR zunächst an Rückenmark-cDNAs versucht. Bei adulten Tiere ließen sich Expressionsunterschiede nachweisen, dabei zeichnete sich jedoch keine Tendenz zu einer niedrigeren Expression in *Sfrs10*$^{FL/FL}$*; Hb9-Cre*-Tieren ab. Der Anteil von Motoneuronen im murinen adulten Rückenmark liegt nur bei 3-5%, womit eine mangelnde Detektion der *Sfrs10*-Deletion zu erklären wäre. Da die Motoneuronen im embryonalen Rückenmark 10-20% des Gesamtanteils ausmachen, wurde nun embryonales Material mittels *Realtime*-PCR auf eine verminderte *Sfrs10*-Expression getestet. Dazu wurden Embryonen an Tag E13.5 präpariert, deren Rückenmark entnommen und daraus RNA gewonnen. Ein Gewebe-Biopsat diente der Genotypisierung. Nach Quantifizierung der RNA-Proben mittels „TECAN Safire^2" und cDNA-Synthese wurden die Proben mit Hilfe von *Realtime*-PCRs quantifiziert. Abbildung 3.32 zeigt die Auswertungen dieser Analysen. Hierbei wurde zunächst die absolute *Sfrs10*-Transkriptmenge über eine reine Quantifizierung der RNA-Mengen mittels „TECAN Safire^2" bestimmt (Abbildung 3.32A). Es konnte keine Korrelation des Genotyps zum *Sfrs10*-Expressionsmuster nachgewiesen werden, so dass von einer mangelnden Sensitivität der Methode auszugehen war. Deshalb wurde die *Sfrs10*-Transkriptmenge in Relation zu der des spezifischen Motoneuronenmarkers Islet1/2 gesetzt. Auch mit dieser Methode war in *Sfrs10*$^{FL/FL}$*; Hb9-Cre*-Embryonen im Vergleich mit *Sfrs10*$^{FL/FL}$-Embryonen keine verminderte *Sfrs10*-Expression detektierbar (Abbildung 3.32B). So zeigte beispielsweise der Embryo E1 trotz des Genotyps *Sfrs10*$^{FL/FL}$*; Hb9-Cre* die höchste *Sfrs10*-Expressionsrate. Bei einem Vergleich mit C57BL/6-wildtypischen Embryonen fielen starke Expressionsunterschiede auf. Doch auch an Embryonen einer Präparation konnten deutliche Expressionsunterschiede beobachtet werden, die jedoch nicht mit dem Genotyp korrelierten.



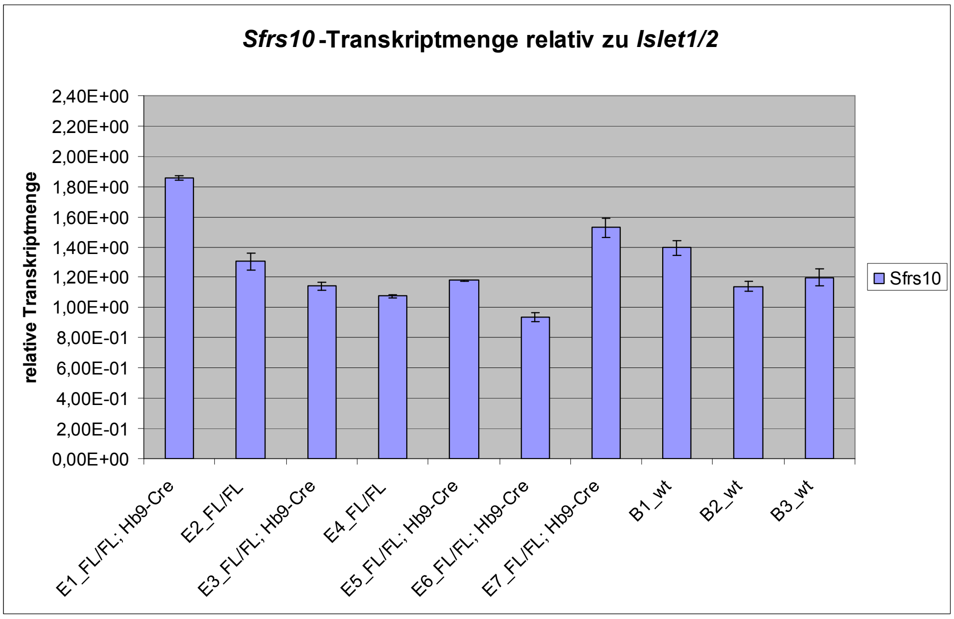
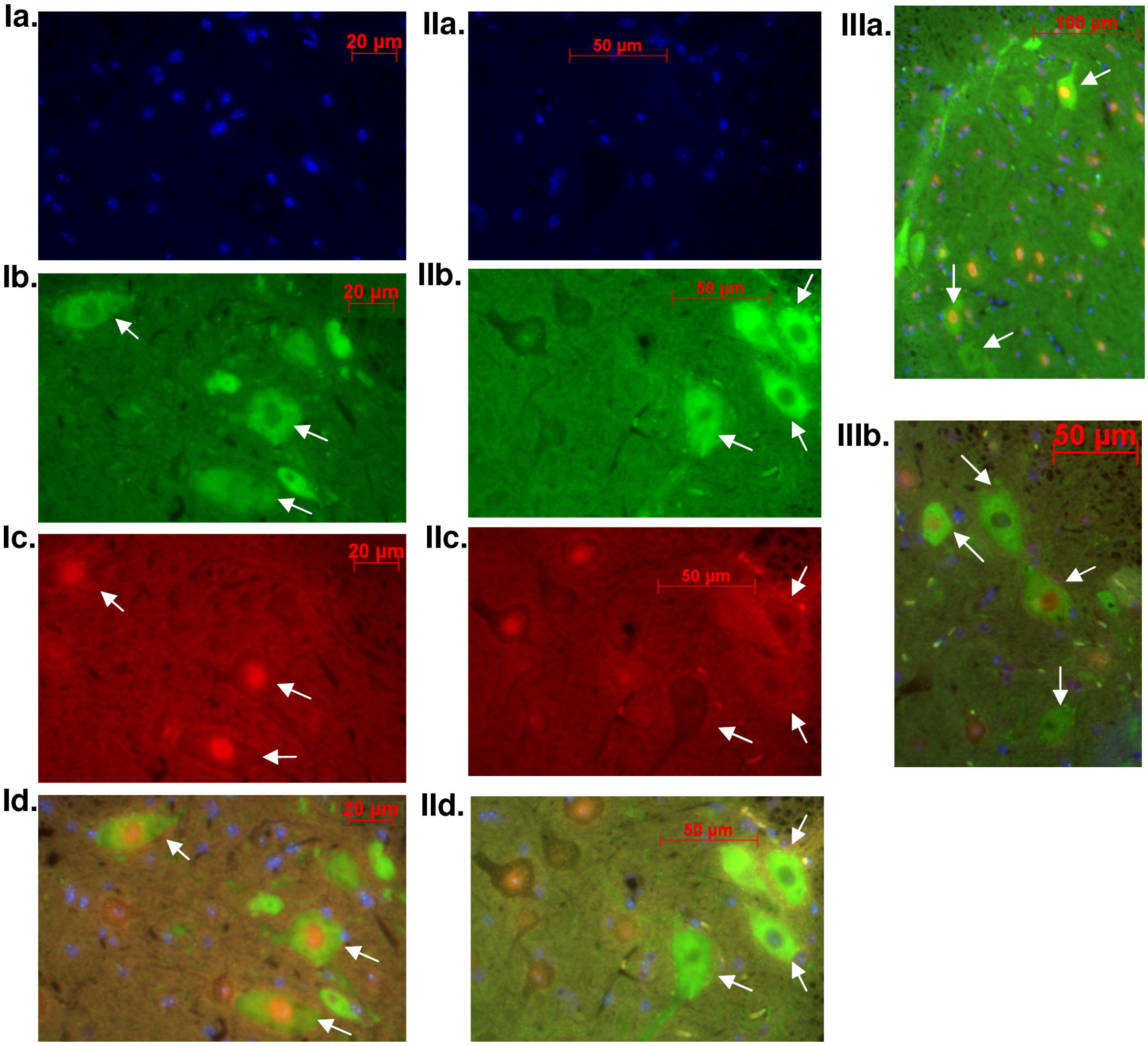


Abbildung 3.32: Quantifizierungen von *Sfrs10-Transkripten* E13.5 mittels *Realtime*-PCR..
A. *Sfrs10*-Transkriptmenge relativ zur Gesamttranskriptmenge; **B**. *Sfrs10*-Transkriptmenge relativ zu *Islet1/2*; Die Genotypen der Embryonen sind angedeutet. Die cDNA wurde aus Rückenmark gewonnen. Der SEM (***s****tandard* ***e****rror of the* ***m****ean*) ist als Balken dargestellt. Die *Sfrs10*-Expressionminderung an *Sfrs10*$^{FL/FL}$*; Hb9-Cre*-Embryonen kann mit dieser Methode nicht nachgewiesen werden.

Mit den vorhergegangenen Methoden konnte die Deletion von *Sfrs10* auf Expressionsebene nicht gezeigt werden, da wegen der limitierten Expression der Cre nur ein geringer Teil der Rückenmarkzellen betroffen war. Die Genotypisierungen wiesen auf eine eindeutige allelische Komposition hin (Abbildung 3.30), mit der jedoch die eigentliche Expressionsminderung nicht bewiesen werden konnte. Um die *Sfrs10*-Deletion spezifisch nachweisen zu können, wurden adulte *Sfrs*$^{FL/FL}$*; Hb9-Cre*-Mäuse und *Sfrs*$^{FL/FL}$-Kontrolltiere immunhistologisch untersucht. Die Tiere wurden perfusionsfixiert, die komplette Wirbelsäule wurde herauspräpariert und mittels

5tägiger Inkubation in Ameisensäure decalzifiziert. Daraufhin wurden Paraffinschnitte angefertigt und mittels immunhistologischer Fluoreszenzfärbungen (2.8.7) untersucht. Die Schnitte wurden in einer Doppelfärbung einerseits mit einem Antikörper gegen Cholinacetyltransferase (ChAT) gefärbt, wobei dieser alle cholinergen Neuronen anfärbt, die Motoneuronen jedoch wegen ihrer Größe und Lage im Vorderhorn gut zu differenzieren sind. Andererseits wurden die Schnitte mit einem Antikörper gegen Sfrs10 inkubiert. Mit der Verwendung verschiedenfarbig fluoreszierender Sekundärantikörper (ChAT = Alexa Fluor®488/grün; Sfrs10 = Alexa Fluor®546/gelb-rot) konnten die beiden Färbungen voneinander differenziert werden (Abbildung 3.33). Eine weitere Differenzierung erfolgte über die Lokalisation der Proteine: ChAT liegt weitgehend im Cytoplasma der Neuronen vor, während Sfrs10 als Spleißfaktor im Nucleus lokalisiert ist (Abbildung 3.33). Zudem erfolgte eine Kernfärbung mit „Hoechst 33342 Dye“ (blau). Abbildung 3.33 stellt die Ergebnisse einer der beschriebenen Immunfluoreszenzfärbungen dar. Bei den sorgfältigen Analysen der verschiedenen Schnitte fielen wenige Motoneuronen-ähnliche Zellen von *Sfrs10*$^{FL/FL}$*; Hb9-Cre*-Tieren auf, die ein Sfrs10-positives Signal aufwiesen (Abbildung 3.33 IIIa/b). Da der ChAT-Antikörper nicht ausschließlich Motoneuronen färbt, ist nicht auszuschließen, dass es sich bei solchen Zellen um andere cholinerge Neuronen handelt, die wegen ihrer Größe und Lage Motoneuronen-ähnlich sind. Auch eine niedrige Effizienz der Hb9-Cre-vermittelten *Sfrs10*-Deletion ist möglich, wenn der Locus für diese Rekombinase schwer zugänglich wäre. Trotz dieser Feststellung konnte der *Sfrs10-knock-out* mit dieser Methode gezeigt werden. In den Motoneuronen von *Sfrs10*$^{FL/FL}$-Mäusen (Abbildung 3.33 Ia-d) war deutlich ein Sfrs10-Signal detektierbar, während *Sfrs10*$^{FL/FL}$*; Hb9-Cre*-Mäuse (Abbildung 3.33 IIa-d) dieses Signal nicht aufwiesen. Die Hb9-Cre-induzierte *Sfrs10*-Deletion konnte somit auch auf der Expressionsebene nachgewiesen werden. Wie beschrieben (3.5.2) zeigten die *Sfrs10*$^{FL/FL}$*; Hb9-Cre*-Tiere keinen motorischen Phänotyp. Obwohl *in vitro* keine Auswirkungen der *Sfrs10*-Deletion auf das Spleißen des VL-*Smn* nachgewiesen werden konnten (3.5.3), soll der Kontext von *Smn* und Sfrs10 weiter untersucht werden. Die ersten Doppelfärbungen von Smn und Sfrs10 in *Sfrs10*$^{FL/FL}$*; Hb9-Cre*- im Vergleich mit *Sfrs10*$^{FL/FL}$-Tieren zeigten keine Unterschiede in der Smn-Expression. Diese Daten müssen jedoch mit weiteren Färbungen von Rückenmarkschnitten und von isolierten Motoneuronen ergänzt werden. Die Methoden zur Generierung von Motoneuronenkultur werden zurzeit in unseren Laboratorien etabliert.



<u>Abbildung 3.33:</u> Fluoreszenzfärbungen von Rückenmarkquerschnitten von *Sfrs10*$^{FL/FL}$- (**Ia.-d.**) oder *Sfrs10*$^{FL/FL}$*; Hb9-Cre*-Mäusen (**IIa.-IId.**) im Alter von 18 Wochen; weiße Pfeile deuten Motoneuronen an. **a**. Zellkernfärbung mit „Hoechst 3342 Dye“ (blau); **b**. ChAT (grün); **c**. Sfrs10 (rot); **d.** Überlagerung von a-c.; *Sfrs10*$^{FL/FL}$*-Mäuse* zeigen ein deutliches Signal in Motoneuronen (**Id.**), während *Sfrs10*$^{FL/FL}$*; Hb9-Cre*-Tiere dieses Signal nicht aufweisen (**IId.**). **IIIa/b**. auch in (Moto-)neuronen von *Sfrs10*$^{FL/FL}$*, Hb9-Cre*-Mäusen ist teilweise ein Sfrs10-Signal detektierbar. Da ChAT auch andere cholinerge Neuronen färbt, ist unklar, ob es sich bei diesen Zellen um Motoneuronen handelt. Auch eine geringe Effizienz der Hb9-Cre-vermittelten Deletion in Motoneuronen ist möglich.

3.5.3 Generierung und Analysen von *Sfrs10*-homozygot-gefloxten murinen embryonalen Fibroblasten (MEFs)

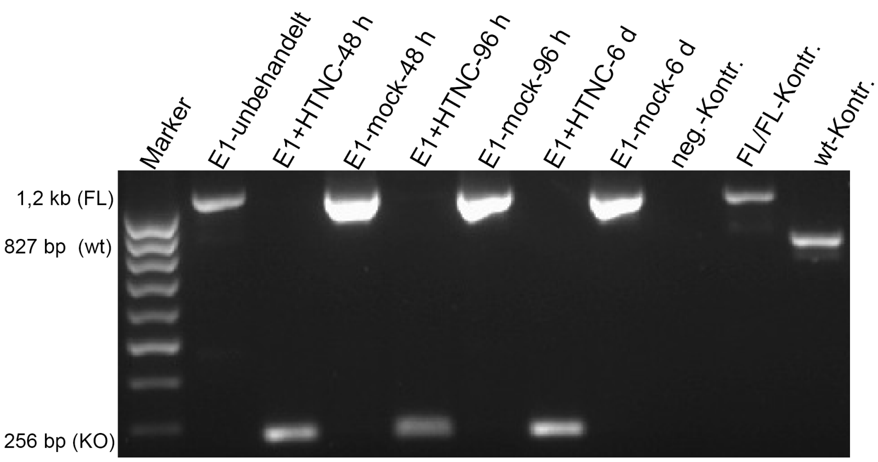
Mit den Analysen des *Sfrs10*$^{-/-}$-Phänotyps (3.4) wurde gezeigt, dass das Protein eine essentielle Funktion während der Embryonalentwicklung hat. Zudem konnte eine frühe ubiquitäre Expression des Proteins in wildtypischen Embryonen nachgewiesen werden, so dass nicht auszuschließen war, dass auch die Deletion des Gens in spezifischen Geweben zur Letalität führen würde. Ferner wurden die Analysen von *Sfrs10*$^{FL/FL}$*; Hb9-Cre*-Tieren wegen des Mangels eines offensichtlichen Phänotyps und der schweren Zugänglichkeit der Motoneuronen erschwert. Um die *Sfrs10*-Deletion und deren Auswirkungen insbesondere auf das *Smn*-Spleißen genauer untersuchen zu können, wurden *Sfrs10*$^{FL/FL}$-MEFs für *in vitro*-Untersuchungen generiert. Diese wurden von Embryonen einer Interkreuzung zweier *Sfrs10*$^{FL/FL}$-Tiere an E13.5 gewonnen (2.9.4.1). Die Embryonen wurden zur Generierung der Zelllinien nicht gemischt – pro Zelllinie wurde nur ein Embryo verwendet. Die Genotypen der Embryonen (*Sfrs10*$^{FL/FL}$) wurden mit PCRs verifiziert.

Die Analysen von *Sfrs10*$^{FL/FL}$-MEFs umfassten die HTN-Cre-induzierte *Sfrs10*-Deletion (siehe 3.5.3.1) und die anschließenden Quantifizierungen der Sfrs10-Protein- und RNA-Konzentrationen. Da der Schwerpunkt der Forschungen unserer Arbeitsgruppe in der molekulare Genetik der SMA liegt und SFRS10 bereits als wichtiger Spleißfaktor für *SMN* identifiziert wurde (Hofmann et al. 2000), sollte ferner der Effekt der *Sfrs10*-Deletion auf die *Smn*-Expression untersucht werden.

3.5.3.1 HTN-Cre-Behandlung und Analysen von *Sfrs10*$^{FL/FL}$-MEFs

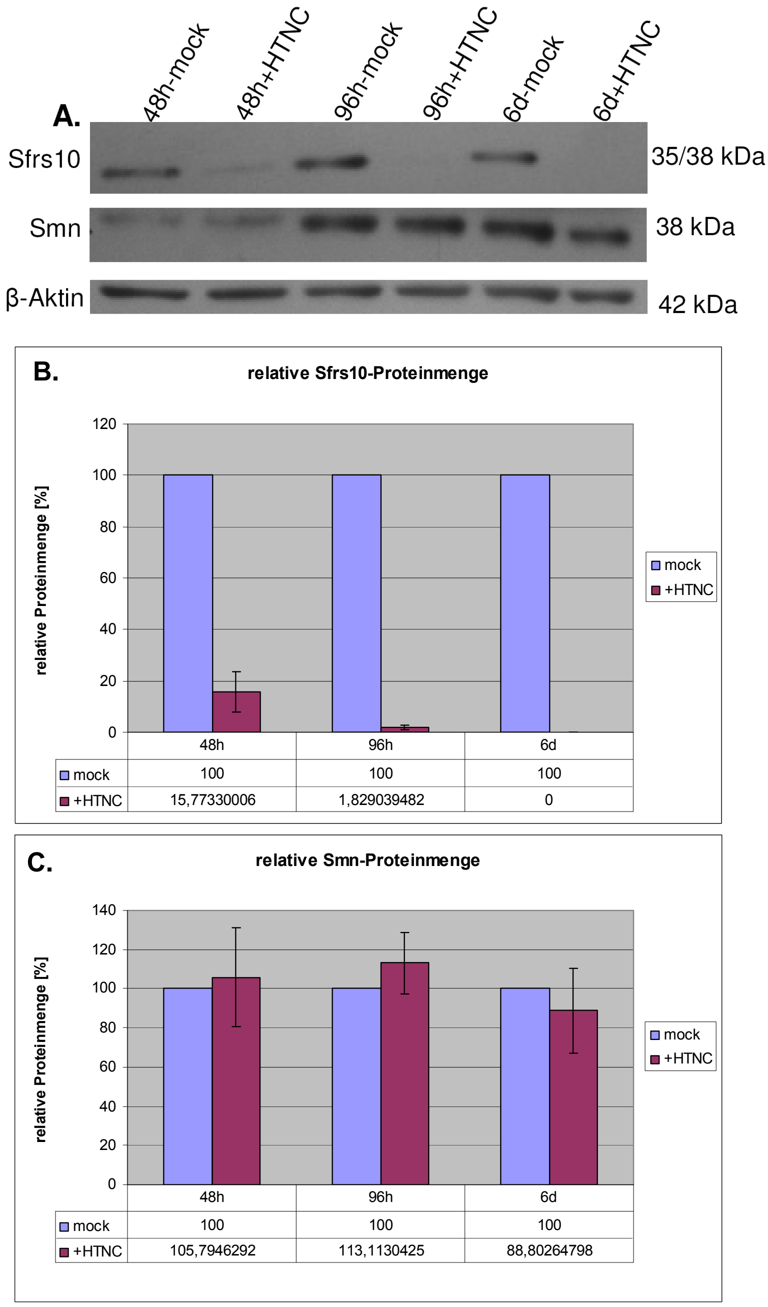
Um den Effekt einer *in vitro*-Deletion von *Sfrs10* untersuchen zu können, wurden *Sfrs10*$^{FL/FL}$-Fibroblastenzelllinien mit rekombinantem, zellpermeablem HTN-Cre-Protein behandelt (Peitz et al. 2002) oder – für eine vergleichende Kontrolle – *mock*-behandelt (2.9.6). In einigen Vorversuchen mit anschließenden *Western Blot*-Analysen waren verschiedene Inkubationszeiten nach der Cre-Behandlung getestet worden, so dass die Zellen in den eigentlichen Versuchsreihen nach 48 h, 96 h und nach 6 Tagen geerntet und für weitere Analysen aufbereitet wurden. Die HTN-Cre-behandelten Zellen wiesen keinen erkennbaren Phänotyp auf – es zeigten sich weder Einschränkungen des proliferativen Potentials noch Indizien für vermehrte apoptotische Prozesse. Die Zellen wurden sowohl für die Analysen auf Protein- als auch auf RNA-Ebene für jede Inkubationszeit im Triplikat untersucht. Zur Verifizierung der Daten wurde die Versuchsreihe mit zwei verschiedenen Zelllinien wiederholt. Zur Genotypisierung wurde vor jeder Versuchsreihe von einigen Zellen DNA gewonnen und in PCRs getestet. Abbildung 3.34 zeigt die

Ergebnisse einer Genotypisierung der *Sfrs10*$^{FL/FL}$-Zelllinie E1 vor und nach HTNC- bzw. *mock*-Behandlung. Die unbehandelten wie die *mock*-behandelten Zellen weisen eindeutig den *Sfrs10*$^{FL/FL}$-Genotyp auf, während sich von DNA HTN-Cre behandelter Zellen bereits nach 48 h ausschließlich das *Sfrs10*$^{-/-}$-Signal amplifizieren lässt (vgl. Abbildung 3.13A und Abbildung 3.27A)



<u>Abbildung 3.34:</u> Genotypisierung HTN-Cre-behandelter *Sfrs10*$^{FL/FL}$-MEFs. Auf einem Agarose-Gel separierte PCR-Produkte zur Genotypisierung HTNC- und *mock*-behandelter *Sfrs10*$^{FL/FL}$-MEFs. Folgende Fragmente wurden mit den Primern (2507/3263) amplifiziert: wt = 827 bp; KO = 256 bp; FL = 1,2 kb. Bereits 48 h nach HTN-Cre-Behandlung ist in den Zellen ausschließlich das *knock-out* Signal zu detektieren.

Um den Effekt der auf DNA-Ebene gezeigten Deletion des *Sfrs10* analysieren zu können, wurden aus den behandelten MEFs Proteinextrakte gewonnen (2.8.2) und in anschließenden *Western Blot*-Analysen untersucht (2.8.5). Im Vergleich mit *mock*-behandelten Zellen war die Sfrs10-Proteinmenge bereits 48 h nach Behandlung mit HTN-Cre auf 15% gesunken. Nach sechs Tagen konnte mittels *Western Blot*-Analysen von Proteinen HTNC-behandelter Zellen kein Sfrs10-Protein mehr detektiert werden. In Bezug auf das Smn-Protein ergaben die *Western Blot*-Analysen der HTNC-behandelten Zellen verglichen mit *mock*-behandelten Zellen keine Smn-Expressionsabweichungen. Abbildung 3.35A zeigt eine Autoradiographie der geschilderten Analysen. In den Abbildung 3.35B und C sind die Quantifizierungen der Autoradiographien für Sfrs10 und Smn relativ zu Aktin dargestellt.



<u>Abbildung 3.35:</u> Protein-Analysen HTN-Cre- und *mock*-behandelter *Sfrs10*$^{FL/FL}$-MEFs.
A. Autoradiographie eines *Western Blots*. Es wurden 6 µg Proteine verwendet und mit verschiedenen Antikörpern gefärbt. **B**. und **C**. Mittelwerte der Proteinkonzentrationen in HTNC und unbehandelten Zellen relativ zu β-Aktin. Die Versuchsreihe umfasste die Auswertung von Triplikaten. Die Proteinkonzentrationen der HTNC-behandelten Zellen wurden in Relation zu der Konzentration von *mock*-behandelten Zellen gesetzt. Der Balken deutet den SEM (*standard **error** of the **mean***) an. **B.** Der HTN-Cre-vermittelte *knock-out* von *Sfrs10* resultiert schon nach 6 Tagen in einem kompletten Verlust an Sfrs10-Protein. **C.** Der HTN-Cre-vermittelte *knock-out* von *Sfrs10* hat keinen Einfluss auf die Smn-Proteinmenge.

Die Konsequenzen der *Sfrs10*-Deletion in den murinen Fibroblasten wurde auch auf RNA-Ebene untersucht. Die Zellen wurden – wie beschrieben – HTN-Cre- oder *mock*-behandelt, nach unterschiedlichen Zeitpunkten zur RNA-Isolation aufbereitet (2.7.11.2) und mittels quantitativer RT-PCRs untersucht (2.7.14, Tabelle 2.2), wobei jede cDNA-Probe im Duplikat gemessen wurde. Hierbei wurden neben den *Sfrs10*-Transkripten auch *Smn*-Transkriptmengen quantifiziert. Die Abbildung 3.36A und B zeigen die Auswertungen dieser Transkriptquantifizierungen. In HTN-Cre-behandelten Zellen konnte bereits nach 48 h eine signifikanter *Sfrs10*-Expressionsreduktion auf nur noch 3% – verglichen mit *mock*-behandelten Zellen – festgestellt werden (Abbildung 3.36A). Diese extrem niedrigen *Sfrs10*-Expressionslevel von 2-4% waren auch nach 96 h und nach 6 Tagen feststellbar. Die *Smn*-Transkriptmenge zwischen *Sfrs10*$^{FL/FL}$- und *Sfrs10*$^{-/-}$-MEFS zeigte jedoch keine signifikanten Abweichungen (Abbildung 3.36B).
Die Maus weist nur das Äquivalent zum h*SMN1*, nicht aber eines zum *SMN2* auf (DiDonato et al. 1999; DiDonato et al. 1997; Viollet et al. 1997); bisher wurde kein murines *Smn*Δ*7*-Äquivalent nachgewiesen. Da SFRS10 bei Überexpression das Spleißmuster des *SMN2* zugunsten des Volllängetranskriptes zu revertieren vermag (Hofmann et al. 2000), wurde die Hypothese aufgestellt, bei Deletion von *Sfrs10* könnte eine murine *Smn*Δ*7*-Form generiert werden. Zur Überprüfung dieser Vermutung wurde in Kombination mit einem Primer in Exon 8 ein für die hypothetische *Smn*Δ*7*-Form-spezifischer Primer verwendet, wobei dessen Sequenz von Teilen des Exons 6 und des Exons 8 gebildet wurde. Die *SmnΔ7*-Variante wäre bei Amplifikation mit einer abweichenden Größe vom VL-*Smn* zu differenzieren gewesen. Die ersten PCR-Tests mit diesem Primer ergaben ein Amplifikat der erwarteten Größe für eine *Smn*Δ*7*-Form auch in wildtypischen Material (vgl. Abbildung 3.37A). Um ausschließen zu können, dass dieses Amplifikat über eine Bindung der halben Primersequenz an Exon 8 des VL-*Smn* generiert werden könnte, wurden zwei weitere *Smn*Δ*7*-spezifische Primer erstellt und getestet. Die Basenpaarzusammensetzung dieser Primer wurde ebenfalls jeweils von Sequenzen der Exon 6-Exon 8-Grenze gebildet. Auch mit diesen unterschiedlichen Primerkombinationen konnte mit cDNA von wildtypischem Gewebe jeweils ein Amplifikat der Größe des *Smn*Δ*7* detektiert werden (Abbildung 3.37).
Über Quantifizierungen der *Smn*Δ*7*-Transkripte mittels *Realtime*-PCRs in HTN-Cre- und *mock*-behandelten Zellen konnte ein signifikanter Anstieg dieser Isoform nach den verschiedenen Inkubationszeiten auf das 3-4fache festgestellt werden (Abbildung 3.36C). Die geschilderten Analysen konnten mit zwei unabhängigen *Sfrs10*$^{FL/FL}$-Zelllinien reproduziert werden, wobei die zweite Zelllinie einen *Smn*Δ*7*-Transkriptanstieg um das 2-3fache zeigte.

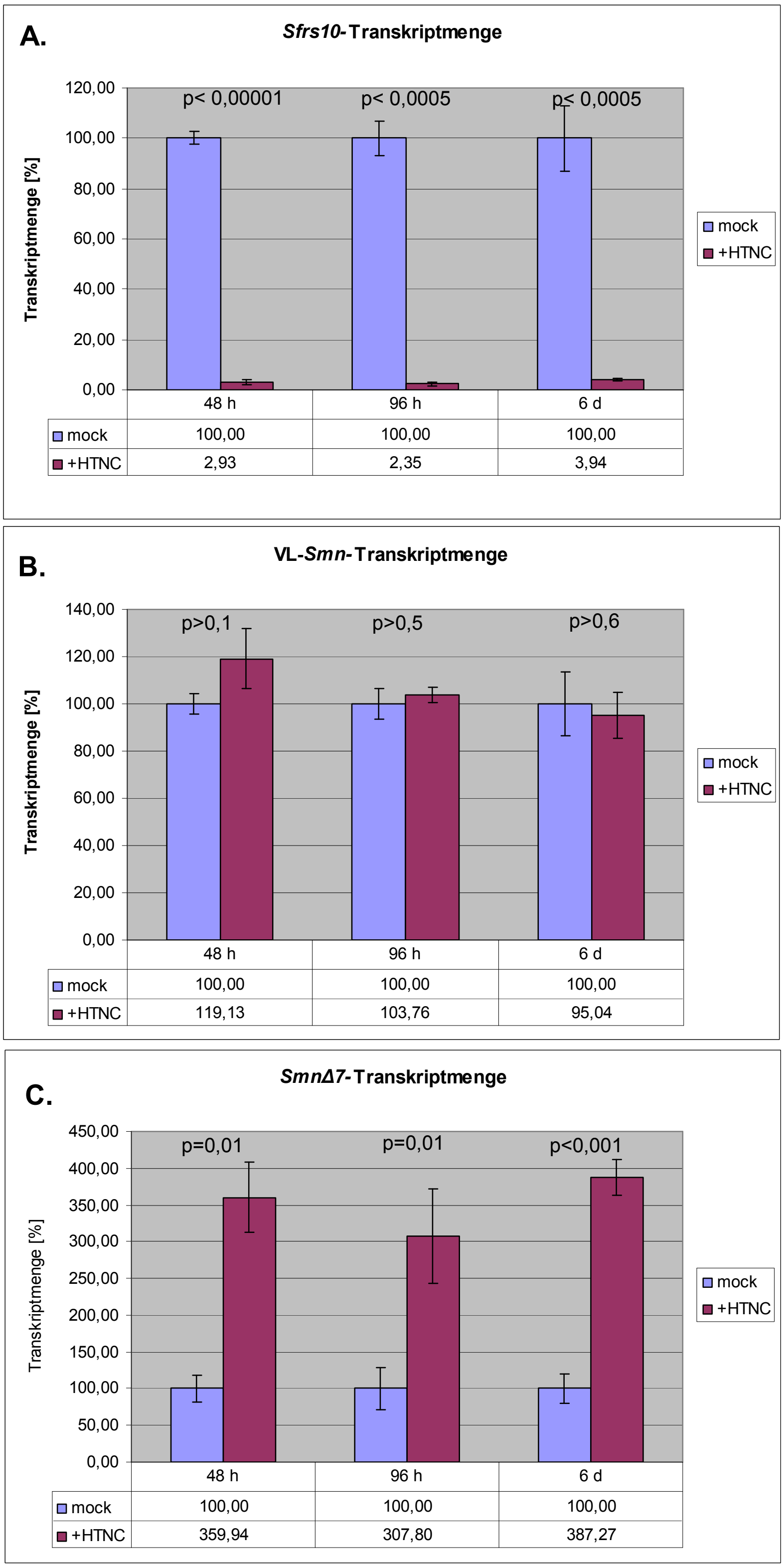
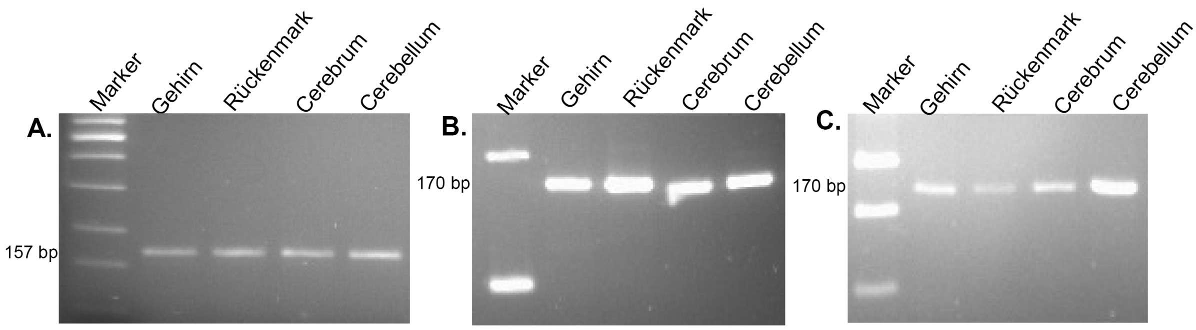


Abbildung 3.36: Transkriptmessungen von HTN-Cre- und *mock*-behandelten *Sfrs10*$^{FL/FL}$-MEFs. Die Transkripte wurden mittels *Realtime*-PCR quantifiziert, wobei die *Sfrs10*-Transkriptmenge relativ zur Gesamttranskriptmenge gesetzt wurde. Die Diagramme zeigen die Mittelwerte einer Triplikatmessung an. Der SEM ist als Balken dargestellt. Der p-Wert ist angegeben (Signifikanz: $p<0{,}05$) **A.** Bestimmung der *Sfrs10*-Transkriptmenge (Primer: 3218/3219). Der HTN-Cre-vermittelte *knock-out* von *Sfrs10* bewirkt eine signifikante *Sfrs10*-Expressionsminderung auf ~3%. **B**. Bestimmung der VL-*Smn*-Transkriptmenge (Primer: 3434/3435). Der HTN-Cre-vermittelte *knock-out* von *Sfrs10* hat keine Konsequenzen auf die VL-*Smn*-Expression. **C**. Bestimmung der *SmnΔ7*-Transkriptmenge (Primer: 3439/3440). Der HTN-Cre-vermittelte *knock-out* von *Sfrs10* führt zu einem signifikanten 3-4fachen Anstieg des aberranten *SmnΔ7*-Transkripts.



<u>Abbildung 3.37:</u> Generierung des *Smn∆7* vom *Smn*-Gen; Auf einem 3%igen Agarose-Gel separierte Produkte verschiedener *Smn∆7*-spezifischer PCRs. Als Matrize diente cDNA unterschiedlicher Gewebe. Es wurden folgende Primerkombinationen verwendet: **A**. 3439/3440; 157 bp; **B**. 3651/3581; 170 bp; **C**. 3439/3652; 170 bp.

3.6 Vom *targeting*-Konstrukt zu den verschiedenen *Sfrs10*-Mauslinien

In Abbildung 3.38 ist der Ablauf von der Transfektion des *targeting*-Konstruktes pRF-*Sfrs10* bis zur Generierung der verschiedenen *Sfrs10*-Maus-Linien zusammenfassend dargestellt.

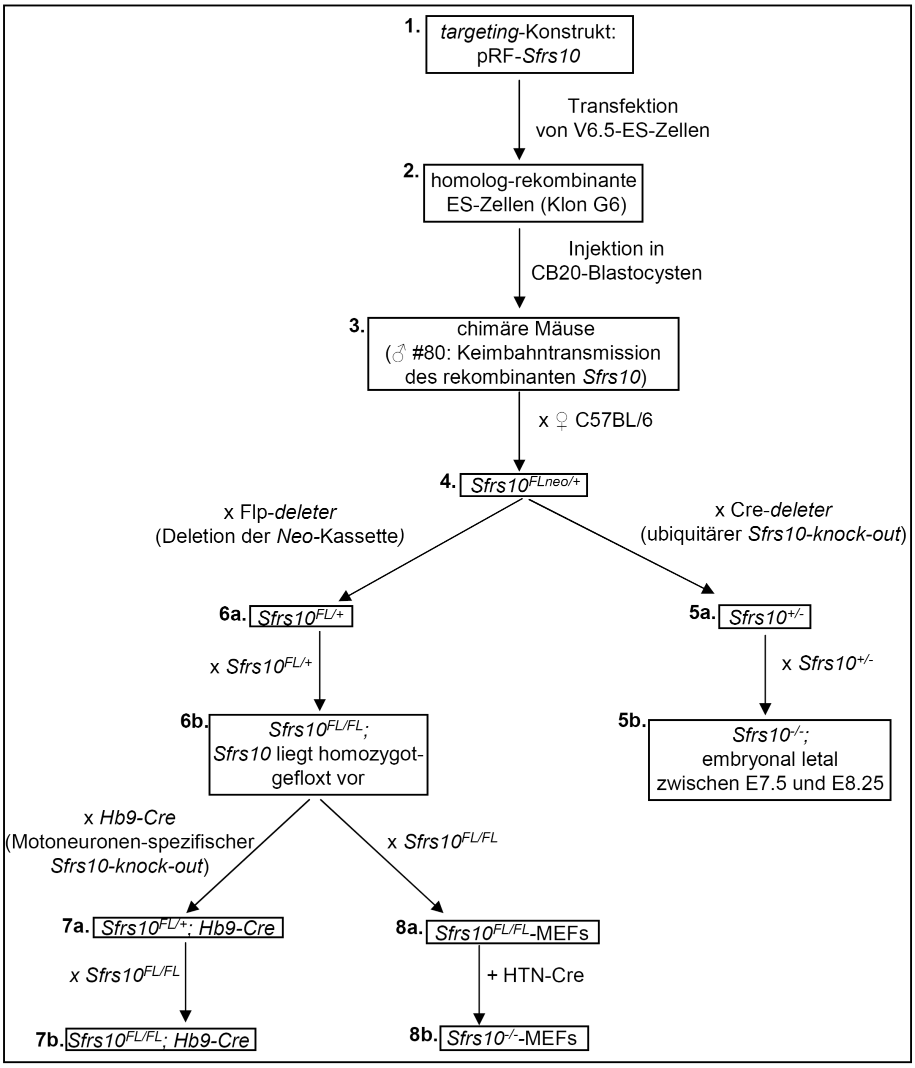


Abbildung 3.38: **Ablaufschaubild zur Generierung der verschiedenen *Sfrs10*-Linien.**
Mit der Transfektion des pRF-*Sfrs10* (**1.**) in V6.5-ES-Zellen wurden homolog-rekombinante ES-Zell-Klone (**2.**) generiert. Über die Injektion des Klons G6 in CB20-Blastocysten entstand das chimäre Männchen #80 (**3.**). Die rekombinanten ES-Zellen trugen auch zur Bildung von Keimbahnzellen bei, so dass Verpaarungen der Chimäre #80 mit C57BL/6-Weibchen zur Generierung von Nachkommen führten, die heterozygot für das rekombinante *Sfrs10* (*Sfrs10*$^{FLneo/+}$) waren (**4.**). *Sfrs10*$^{FLneo/+}$-Tiere wurden mit einer Cre-*deleter*-Linie (Schwenk et al. 1995) verpaart, so dass der ubiquitäre heterozygote *knock-out* des *Sfrs10* induziert wurde (**5a.**). Über Interkreuzungen der *Sfrs10*$^{+/-}$-Mäuse wurde festgestellt, dass der homozygote *Sfrs10-knock-out* zur embryonalen Letalität zwischen E7.5 und E8.25 führt (**5b.**). Die *Sfrs10*$^{FLneo/+}$- (**4.**) wurde mit einer Flp-*deleter*-Linie (Rodriguez et al. 2000) verpaart, so dass die *Neo*-Kassette deletiert wurde. Die *Sfrs10*-KO-Region lag nun – zunächst im heterozygoten Zustand (**6a.**) – gefloxt vor. Mit Kreuzungen der *Sfrs10*$^{FL/+}$-Tiere untereinander wurde eine Linie generiert, die das *Sfrs10*-Exon 4 homozygot gefloxt trug (**6b.**) und als Ausgangslinie für spezifische konditionale *Sfrs10-knock-outs* diente. Mit Einkreuzen der *Hb9-Cre*-Linie (Arber et al. 1999) wurde die Motoneuronen-spezifische Deletion des *Sfrs10* erzielt. Diese Deletion lag zunächst in heterozygoter Form vor (**7a.**) und wurde über Verpaarungen mit *Sfrs10*$^{FL/FL}$-Tieren auf Homozygotie gekreuzt (**7b.**). Über Interkreuzungen von *Sfrs10*$^{FL/FL}$-Mäusen und Präparation entsprechender Embryonen wurden *Sfrs10*$^{FL/FL}$-MEFs (**8a.**) generiert. Die *Sfrs10*-Deletion in diesen Zellen wurde mit HTN-Cre (Peitz et al. 2002) induziert (**8b.**)

4. Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Mausmodelle für den Spleißfaktor Sfrs10 generiert, etabliert und – soweit möglich – charakterisiert. Einerseits sollte das modulierende Potential des Spleißfaktors auf das *SMN2*-Spleißen *in vivo* analysiert werden. Eine bestehende *SFRS10*-transgene Linie wurde zunächst auf die Expression des *SFRS10* untersucht und sollte letztlich der Generierung einer *SFRS10*-transgenen SMA-Mauslinie dienen, um die SFRS10-vermittelte Revertierung des *SMN2*-Spleißmusters und die potentielle Modulation des SMA-Phänotyps untersuchen zu können.

Um einen Überblick des Wirkungsspektrums von Sfrs10 zu erhalten, sollten andererseits *knock-outs* des Spleißfaktors generiert und charakterisiert werden. Die Deletion des *Sfrs10* erfolgte hierbei konditional unter Verwendung des Cre-loxP-Systems sowohl ubiquitär als auch Motoneuronen-spezifisch und in einer Fibroblastenzelllinie.

4.1 Analysen *SFRS10*-transgener Mäuse

Die *in vitro*-gezeigte SFRS10-vermittelte Revertierung des *SMN2*-Spleißmusters (Hofmann et al. 2000) (siehe 1.5.4) und der potentiell resultierende modulierende Effekt auf den SMA-Phänotyp sollten *in vivo* analysiert und verifiziert werden. Letztlich sollte eine *SFRS10*-transgene *Smn*$^{-/-}$*; SMN2*$^{+/+}$-Maus generiert und charakterisiert werden. Ausgehend für diese Analysen wurde zunächst die neuronal-spezifische Expression des humanen *SFRS10*-Transgens in der bestehenden Maus-Linie *SFRS10*-tg #55 (Yvonne Hofmann, Doktorarbeit) überprüft. Zunächst wurden dafür sowohl Proteine als auch RNA aus dem Rückenmark adulter Tiere isoliert und untersucht. Mittels quantitativer *Western Blot*-Analysen konnte die Expression von SFRS10 in vorab eindeutig als transgen identifizierten adulten Tieren nicht nachgewiesen werden. Der verwendete SFRS10-Antikörper detektiert sowohl die murine als auch die humane Proteinform, so dass kein spezifisches Signal des – vom *SFRS10*-Transgen generierten – Proteins zu erwarten war. Somit erfolgte eine Quantifizierung des SFRS10 in Relation zu dem Haushalts-Protein β-Aktin (Abbildung 3.2).

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen mittels densitometrischer Auswertung ist eine Methode, mit der Proteinkonzentrationen verschiedener Proben verglichen werden können. Die Aktinkonzentrationen sollten hierfür über Angleichen der Proben eines *Western Blots* annähernd gleich sein. Die Anpassungen sind insbesondere bei Proteinproben aus Gewebe oft schwierig, so dass sich ungenaue Messwerte ergeben können. Da das *SFRS10*-Transgen unter Kontrolle des neuronal-spezifischen *NFL*-Promotors nur in einer Subpopulation der Rücken-

markzellen exprimiert werden konnte, war diese Methode zur Detektion der Transgen-Expression vermutlich nicht sensitiv genug. Infolgedessen wurden die Transkripte mit für das humane *SFRS10*-spezifischen Primern mittels der äußerst sensitiven *Realtime*-PCR am *Light-Cycler* untersucht. Mit diesen Untersuchungen konnte keine Expression des *SFRS10*-Transgens in adulten Tieren detektiert werden. Auch in embryonalem Rückenmark, in welchem der Anteil an neuronalen Zellen größer ist, konnte die Transgen-Expression nicht nachgewiesen werden (Abbildung 3.4). Hierbei war zuvor der Genotyp der Embryonen ebenfalls eindeutig bestimmt worden (Abbildung 3.3A). Die Ergebnisse im Rahmen von *Realtime*-PCRs bestätigten sogar die Möglichkeit der Detektion des Motoneuronen-spezifischen Transkripts *Hb9* mit diesem Verfahren (Abbildung 3.3B).

Bei den Analysen wurden schwache *SFRS10*-Signale detektiert, die jedoch sowohl in transgenen als auch in wildtypischen Geschwistern beobachtet wurden (Abbildung 3.4). Diese deuten somit nicht auf eine Expression des Transgens hin. Da die Primer ihre Spezifität für das humane Transkript ausschließlich über wenige Fehlbasenpaarungen in Bezug auf das *Sfrs10* erhielten, stammen die Signale wahrscheinlich von einer „Hintergrund-Amplifikation" des murinen *Sfrs10* auf Transkript- oder auf DNA-Ebene. Letzteres könnte in einer unvollständigen DNA-Restriktion und der starken Abundanz von murinen Pseudogenen für *Sfrs10* begründet sein (vgl. 3.1.3). Das Transgen stand unter Kontrolle des *NFL*-Promotors und wäre somit nicht nur in Motoneuronen exprimiert worden. Ferner inserieren Transgene meist nicht nur in einer Kopie. Daher hätte eine Expression zumindest mit der sensitiven Methode der *Realtime*-PCR detektiert werden müssen. Mit den erläuterten Untersuchungen konnte somit gezeigt werden, dass trotz eindeutiger Präsenz auf genomischer Ebene das *SFRS10*-Transgen nicht exprimiert wurde.

Die mangelnde Expression oder die Inaktivierung von Transgenen ist kein seltenes Ereignis [Reviews (Palmiter and Brinster 1986; Recillas-Targa 2004)]. Dies kann wegen Elementen des Vektors begründet sein, da beispielsweise verwendete Promotoren für eine ineffiziente Expression sorgen. Da die Transkript-Expression von einer transgenen Sequenz mit flankierenden 5'- und 3'-Spleißstellen stabilisiert wird (Choi et al. 1991), könnte auch mit dem Mangel an diesen Sequenzen eine Expressionsinhibition erklärt werden. Die Spleißstellen waren jedoch Teil des zur Generierung der *SFRS10*-transgenen Linie verwendeten Konstruktes (Yvonne Hofman, Doktorarbeit). Auch über prokaryotische Sequenzen des verwendeten Vektors kann eine Transgenexpression inhibiert werden. Diese war in Form der *LacZ*-Sequenz Teil des Konstruktes. Ferner können inhibierende *cis*-Elemente im inserierten genomischen Locus die Transgenexpression beeinflussen. Hierbei kann ein Transgen zunächst in transfizierten Zellen aktiv, wegen regulatorischer *cis*- und interagierender *trans*-Elemente, die möglicherweise entwick-

lungsgesteuert agieren, jedoch *in vivo* inaktiviert werden. Die Expression mancher Transgene kann auch von bestimmten Sequenzen abhängen, die im transgenen Kontext fehlen oder über andere regulatorische Mechanismen kompensiert werden [Reviews (Palmiter and Brinster 1986; Recillas-Targa 2004)]. Über die Methylierung transgener DNA kann ebenfalls deren transkriptionelle Inaktivierung erfolgen (Dandolo et al. 1993; Kato et al. 1996; Lettmann et al. 1991; Shinar et al. 1989). Selten kann auch eine genomische Instabilität zu der Deletion mancher Transgene führen. Hierbei kann zudem über Erhaltungszuchten einer transgenen Mauslinie im Verlauf von Generationen die Inaktivierung oder Deletion von Transgenen erfolgen [Reviews (Palmiter and Brinster 1986; Recillas-Targa 2004)].

Herkömmliche Transgene inserieren ungerichtet und in unbestimmter Kopienzahl ins Genom. Die geschilderten Mechanismen lassen sich zum Teil mit einer homologen Rekombination von Transgenen vermeiden. Hierbei wird die gewünschte Transgen-Sequenz mit Verwendung eines adäquaten *targeting*-Konstrukts über eine homologe Rekombination in einen ungenutzten endogenen Locus mit bekannten regulatorischen Sequenzen – beispielweise *ROSA26*-Locus – gebracht. Das Transgen wird so gezielt und meist nur in einer Kopie inseriert, wobei die Expression über Modifikationen des *targeting*-Konstruktes unter der Kontrolle des endogenen oder eines starken und/oder spezifischen Promotors steht (Kisseberth et al. 1999). Mittels weiterer Modifikationen des *targeting*-Konstruktes mit loxP-Stellen ist mit diesem Verfahren auch eine konditionale Induktion der Transgen-Expression in bestimmten Geweben möglich. In unseren Laboratorien werden seit kurzem alle transgenen Tiere mit dieser Methode generiert.

4.2 Generierung eines *Sfrs10-knock-outs* im Mausmodell

Neben den *SMN*-spezifischen sollte auch das generelle Wirkungsspektrum des Spleißfaktors Sfrs10 *in vivo* beleuchtet werden. Dazu wurde im Rahmen dieser Arbeit ein *Sfrs10-knock-out*-Mausmodell generiert und – soweit möglich – analysiert. Die Methoden zur Realisierung der Versuche wurden in Zusammenarbeit mit Mitarbeitern der AG Prof. Dr. Brüning, Prof. Dr. Pasparakis und Prof. Dr. Schröder durchgeführt und größtenteils in unseren Laboratorien erstmals etabliert. Die Deletion des *Sfrs10* erfolgte mittels des Cre-loxP-Systems, so dass die konditionale Deletion des Gens ermöglicht wurde.

4.2.1 *Targeting* des *Sfrs10* – Strategie, Umsetzung und Generierung chimärer Tiere

Um den *Sfrs10-knock-out* strategisch ausarbeiten zu können, erfolgten zunächst Untersuchungen in Hinblick auf potentielle Spleißvarianten des *Sfrs10*. Von dem humanen *SFRS10*-Gen werden fünf verschiedene Spleißvarianten definierter Exon-Zusammensetzung generiert, von denen nur zwei translatiert werden (Nayler et al. 1998). Für das murine *Sfrs10* sind vier Transkriptvarianten beschrieben, die sich jedoch ausschließlich im 3'-nicht-translatierten Bereich unterscheiden (Segade et al. 1996). Wegen der hohen Homologie des murinen Sfrs10 und des humanen SFRS10 (100% auf Proteinebene) wurden Muskel- und Gehirngewebe unterschiedlicher Mausstämme auf potentielle Spleißvarianten des *Sfrs10* untersucht. Die Strategie für diese Untersuchungen wurde anhand der Erkenntnisse über die humanen Spleißvarianten durchgeführt (3.2.1). Trotz Verwendung einer relativ sensitiven Silberfärbung der analytischen Gele konnten in den untersuchten Geweben keine murinen Spleißvarianten – außer dem *SFRS10-V1*-entsprechenden Äquivalent – detektiert werden (Abbildung 3.5). Nach Erkenntnissen über die humanen SFRS10-Varianten hätten in Gehirn und Muskel die potentiellen murinen Spleißisoformen exprimiert werden müssen. Hierbei kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Methode nicht ausreichend sensitiv zur Detektion der murinen Spleißvarianten war. Deshalb und wegen der hohen Homologie des SFRS10 zwischen den Spezies wurde die *targeting*-Strategie des Gens unter Berücksichtigung der humanen Spleißvarianten generiert. Die *Sfrs10-targeting*-Strategie beinhaltete die Deletion des Exons 4 sowie kurzer 5'- und 3'-benachbarter intronischer Sequenzen. Mit der Deletion dieses Exons wurde eine Leserasterverschiebung induziert, die zur Generierung eines Stopp-Codons in Exon 5 führte. Über diesen Mechanismus wurden alle vom humanen Homolog bekannten Spleißvarianten – bis auf das nicht-translatierte *Sfrs10-v2* – erfasst, so dass keine funktionellen *Sfrs10*-Transkripte bzw. -Proteine generiert werden konnten (3.2.2).

Das *targeting*-Konstrukt pRF-*Sfrs10* wurde anhand der entwickelten Strategie generiert und sorgfältig verifiziert (3.2.3). Bei der Transfektion des pRF-*Sfrs10* wurden zunächst Bruce4-ES-Zellen (Kontgen et al. 1993) verwendet, die einen reinen genetischen C57BL/6-Hintergrund tragen. Bei diesen Experimenten wurden nach den Selektionsschritten 500 Klone isoliert und auf die homologe Rekombination des rekombinanten *Sfrs10* untersucht. Zwei dieser Klone konnten eindeutig als homolog-rekombinant identifiziert werden (3.2.4). Diese wurden in 90 Blastocysten injiziert, womit sechs chimäre Tiere generiert wurden. Nach Verpaarungen dieser Chimären mit C57BL/6-Tieren und Genotypisierungen ihrer Nachkommen konnte jedoch keine Keimbahntransmission des rekombinanten *Sfrs10* festgestellt werden. Mit einer Wiederholung der Transfektionsexperimente des pRF-*Sfrs10* in genetisch hybriden V6.5-ES-Zellen (Sv/129; C57BL/6) (Eggan et al. 2002) konnten von 400 untersuchten Klonen vier eindeutige homolog-rekombinante ES-Zell-Klone identifiziert und verifiziert werden. Die Injektion eines dieser Klone führte zu der Generierung chimärer Tiere, wobei eines eine Keimbahntransmission des rekombinanten *Sfrs10* trug. Dies bestätigte sich nach Verpaarungen des chimären Männchens mit einem C57BL/6-Weibchen und Genotypisierung der Nachkommen mittels PCR- und *Southern*-Analysen (3.2.6) (Abbildung 3.12).

Bereits die Transfektionsexperimente mit Bruce4-ES-Zellen zeigten eine geringere Effizienz als jene mit V6.5-ES-Zellen in Bezug auf homologe Rekombinanten (Rekombinationseffizienz 4 in $1x10^3$ bzw. 1 in $1x10^2$). Für die ersten Transfektionen wurden Bruce4-ES-Zellen verwendet, da alle Experimente mit den Tieren auf einem reinen genetischen C57BL/6-Hintergrund ausgeführt werden sollten. ES-Zellen mit einem hybriden genetischen Hintergrund sind jedoch häufig mit einer höheren Effizienz zu transfizieren und zeigen zudem ein größeres Potential bei der Generierung chimärer Tiere. Hierbei hat die Teilungsgeschwindigkeit der Donor-ES-Zellen im Vergleich mit den Zellen der Akzeptor-Blastocyste eine entscheidende Bedeutung. Je schneller sich die ES-Zellen teilen, desto größer ist schließlich die Anzahl rekombinanter Zellen in einem chimären Tier und desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass auch rekombinante Keimbahnzellen generiert werden. Nur mit ihrer Bildung kann die Modifikation vererbt werden [aus Laboratory Protocols for Conditional Gene Targeting (Torres R. and R. 1997)].

Bruce4-ES-Zellen teilen sich im Vergleich mit Zellen fremder Akzeptor-Blastocysten relativ langsam. Dieser Sachverhalt erklärt auch, dass die drei Fellfarbenchimären, die aus Injektionen von Bruce4-ES-Zellen in CB20-Blastocysten hervorgingen, nur einen niedrigen Chimärismusgrad aufwiesen. Die Injektion dieser ES-Zellen in C57BL/6-Blastocysten schafft eine adäquatere Umgebung in Bezug auf die Teilungsgeschwindigkeit der Zellen. Der Nachteil liegt jedoch in einer mangelnden Abschätzungsmöglichkeit des Chimärismusgrades, da keine Fell-

farbenselektion möglich ist. Der Chimärismus wird ausschließlich mit einer Genotypisierung der Tiere anhand von Schwanzspitzenbiopsaten bestimmt. Daher können chimäre Tiere, die in der Schwanzspitze keine rekombinanten Zellen tragen, nicht detektiert werden. Doch auch bei Verpaarungen von – auf diesem Weg – identifizierten Chimären konnte keine Keimbahntransmission von rekombinanten Bruce4-ES-Zellen detektiert werden.

Der Erfolg solcher Versuche hängt neben der Art der verwendeten ES-Zellen und Blastocysten von zahlreichen weiteren Parametern ab – so von der Anzahl der Passagen von ES-Zellen (Fedorov et al. 1997), der Qualität der ES-Zell-Klone am Injektionstag, der Anzahl und Qualität der injizierten Blastocysten und dem erfolgreichen Transfer der manipulierten Blastocysten.

Letztlich konnte mit der Verwendung der genetisch hybriden V6.5-ES-Zelllinie eine erfolgreiche Keimbahntransmission und somit eine stabile Vererbung des rekombinanten *Sfrs10* erreicht werden. Über stete Rückkreuzungen der *Sfrs10*-Linien wurde der ursprünglich hybride genetische Hintergrund der V6.5-ES-Zellen (129/Sv und C57BL/6) kontinuierlich auf einen reinen C57BL/6-genetischen Hintergrund gebracht. Bei Konzeption dieses Manuskripts betrug der Anteil an C57BL/6 in der *Sfrs10*$^{+/-}$-Linie im Rahmen der Berechnungen nahezu 100% (nach sechs Rückkreuzungen mit C57BL/6) und der von *Sfrs10*$^{FLneo/+}$-, *Sfrs10*$^{FL/FL}$- und *Sfrs10*$^{FL/FL}$*; Hb9-Cre*-Linien 70-80% (nach drei bis vier Rückkreuzungen mit C57/BL6).

4.3 Generierung und Analysen des ubiquitären *Sfrs10-knock-outs* im Mausmodell

Das verwendete *targeting*-Konstrukt pRF-*Sfrs10* trug eine Modifikation mit loxP-Stellen, so dass der *Sfrs10-knock-out* mit Einkreuzen von Cre-Rekombinase-exprimierenden Maus-Linien erst induziert werden musste. Hierbei erfolgte die Deletion zunächst ubiquitär mittels einer Cre-*deleter*-Linie, die das *Cre*-Transgen unter Kontrolle des *CMV*-Promotors exprimiert (Schwenk et al. 1995).

4.3.1 Analysen heterozygoter *Sfrs10-knock-out*-Mäuse

Die heterozygoten *Sfrs10-knock-out*-Mäuse zeigten keinerlei phänotypische Auffälligkeiten. Die Quantifizierungen der Sfrs10-Proteinkonzentrationen an Embryonen (E12.5) sowie an Gehirn und Testis adulter Tiere bei heterozygoten *Sfrs10-knock-out*-Mäusen und wildtypischen Geschwistern zeigten eine Tendenz zu einer geringeren Expression (30-40%) bei *Sfrs10*$^{+/-}$-Tieren (3.4.2.1). Die Quantifizierung der Proteinkonzentrationen erfolgte mit Hilfe densitometrischer Analysen der Sfrs10-Banden relativ zu β-Aktin. Wie bereits unter 4.1 beschrieben ist diese Methode zur absoluten Quantifizierung nicht sehr sensitiv. So kann eine Halbierung der Proteinexpression – wie sie bei einem heterozygoten *knock-out* zu erwarten wäre – nicht zuverlässig nachgewiesen werden. Erschwerend kommt bei der Quantifizierung von aus Geweben gewonnenen Proteinen die Anpassung der Proteinkonzentrationen von Proben eines *Blots* hinzu. Dennoch bestätigte sich eine Tendenz zu einer geringeren Sfrs10-Expression in *Sfrs10*$^{+/-}$-Mäusen auch bei wiederholten Versuchen (30-40%ige reduzierte Expression im Vergleich mit *Sfrs10*$^{+/+}$-Mäusen). Interessanterweise zeigte sich bei Analysen von Proteinen aus Testis neben der allgemeinen Tendenz zur geringeren Sfrs10-Expression eine Revertierung des Protein-Phosphorylierungsmusters. Hierbei war bei den heterozygoten *knock-out*-Tieren vermehrt die phosphorylierte Form von Sfrs10 nachweisbar, während bei wildtypischen Geschwistern eindeutig eine höhere Konzentration der dephosphorylierten Proteinform festzustellen war (Abbildung 3.17). Trotz der Detektion beider Phosphorylierungsformen im Gehirn und einer verminderten Sfrs10-Expression bei *Sfrs10*$^{+/-}$-Tieren, konnte keine Änderung des Phosphorylierungsstatus in diesem Gewebe beobachtet werden (Abbildung 3.16A).

Die Konzentration des humanen SFRS10 in der Zelle unterliegt regulativen Prozessen (1.4.1) (Novoyatleva et al. 2008; Stoilov et al. 2004). Neben autoregulativen Mechanismen führt ein veränderter Phosphorylierungsstatus des Proteins zu einer veränderten Spleißstellenselektion. So wurde gezeigt, dass die Phosphatase-1-vermittelte Dephosphorylierung von SFRS10 die

Inhibition des Einschlusses bestimmter Exons nach sich zieht (Novoyatleva et al. 2008). Wegen der 100%igen Homologie des murinen Sfrs10 und des humanen SFRS10 auf Proteinebene könnten ähnliche regulative Mechanismen bei der Maus vorliegen. Infolge der Phosphorylierung des Sfrs10 und der damit bedingten veränderten Spleißstellenselektion könnte eine geringere Konzentration des Proteins – wie beispielsweise mit dem heterozygoten *Sfrs10-knock-out* – kompensiert werden. Sfrs10 wird in Testis stark exprimiert, was mit nachgewiesenen Interaktionen von spezifischen Proteinen (Venables et al. 2005; Venables et al. 2000) eine Bedeutung des Spleißfaktors an der Spermatogenese bzw. an Keimbahn-spezifischen alternativen Spleißprozessen, vermuten lässt (siehe auch 1.4.3). Somit könnte die beobachtete Revertierung des Sfrs10-Phosphorylierungsstatus in Testis von *Sfrs10*$^{+/-}$-Männchen einen potentiellen regulativen Mechanismus darstellen, um trotz der geringeren Sfrs10-Konzentration das korrekte Spleißen zu gewährleisten. Diese Hypothese wird von der Beobachtung gestützt, dass *Sfrs10*$^{+/-}$-Männchen keine verringerte Fertiliät im Vergleich mit wildtypischen Mäusen zeigten. Auch in fortgeschrittenem Alter (1½ Jahre) wiesen die beobachteten *Sfrs10*$^{+/-}$-Tiere keine verminderte Fertilität auf und erzielten bei Verpaarungen geläufige Wurfgrößen.

Die geschilderten Testis-spezifischen Modifikationen der Sfrs10-Expression bei *Sfrs10*$^{+/-}$-Männchen könnten interessante Ansatzpunkte für weitere Analysen bieten. Über Untersuchungen von alternativ gespleißten Transkripten an Testis-Proben der *Sfrs10*$^{+/-}$-Männchen könnten – wegen der modifizierten Sfrs10-Form bedingte – potentielle Spleißaberrationen detektiert werden. Weiterhin könnte die Sfrs10-vermittelte Regulation von Testis- oder für die Spermatogenese-spezifischen Transkripten über einen für die männliche Keimbahn-spezifischen *knock-out* des *Sfrs10* – beispielsweise Prm1-Cre-vermittelt (O'Gorman et al. 1997) – untersucht werden. Trotz der erwarteten Infertilität der Männchen könnte das Testisgewebe auf Veränderungen von alternativ gespleißten Transkripten und weiteren regulatorischen Faktoren analysiert werden, zumal alternative Spleißprozesse in diesem Gewebe vermehrt vorkommen (Yeo et al. 2004).

In *Drosophila* spielt das Sfrs10-Ortholog Tra2 eine bedeutende Rolle in Spleißprozessen der geschlechtsdeterminierenden Kaskade (Tian and Maniatis 1993) (siehe 1.4). Obwohl die Funktionen von Sfrs10 und dem *Drosophila*-Ortholog Tra2 nicht vollständig erhalten sind, scheinen zumindest gewisse Funktionen konserviert zu sein – auch in der Taufliege hat Tra2 eine Bedeutung bei der Spermatogenese (Belote and Baker 1983).

4.3.2 Analysen homozygoter *Sfrs10-knock-out*-Mäuse

Da aus den Interkreuzungen von *Sfrs10*$^{+/-}$-Tieren keine *Sfrs10*$^{-/-}$-Nachkommen resultierten, wurde vermutet, dass die homozygote Deletion des *Sfrs10* zur Letalität während der Embryonalentwicklung führte. Diese Hypothese wird von der Beobachtung gestützt, dass auch mit Interkreuzungen zwischen *Sfrs10*$^{FLneo/+}$ -Tieren keine *Sfrs10*$^{FLneo/FLneo}$-Nachkommen detektiert wurden (Tabelle 3.3). Die *Neomycin*-Kassette war Teil des *targeting*-Konstruktes pRF-*Sfrs10* und diente der Selektion homolog-rekombinanter ES-Zell-Klone nach den Transfektionen. Bei Nachkommen des *Sfrs10*$^{FLneo/+}$-keimbahntransmittierten chimären Männchens #80 war dieses Resistenzgen zunächst noch erhalten (vgl. Abbildung 3.9A). Erst nach Kreuzungen mit Flp- bzw. Cre-*deleter*-Mäusen (Rodriguez et al. 2000; Schwenk et al. 1995) wurde die *Neo*-Kassette *in vivo* deletiert. Wegen des starken Promotors und der Insertion des *Neo*-Gens im endogenen *Sfrs10*-Locus ist eine Einschränkung der *Sfrs10*-Genfunktion sehr wahrscheinlich. So könnte die Insertion des *Neo*-Gens beispielsweise regulatorische intronische Sequenzelemente beeinflussen. Der völlige Funktionsverlust des Gens ist dabei nicht unbedingt gegeben. Der Mangel an *Sfrs10*$^{FLneo/FLneo}$-Nachkommen deutet jedoch zumindest auf eine starke Einschränkung der normalen Proteinexpression hin.

Gen *knock-outs*, die in einer embryonalen Letalität resultieren, werden je nach dem zeitlichen Auftreten prinzipiell in fünf Gruppen differenziert: **1.** Letalität vor der Implantation bis E4.5; **2.** Letalität während oder kurz nach der Implantation um E4.5-E5.5; **3.** Letalität während der Gastrulation um E6.5-7.5; **4.** Letalität während der frühen Organogenese ab E7.5 und **5.** Letalität während der frühen fetalen Entwicklung [Review (Copp 1995)]. Die sehr frühe Letalität bis E4.5 ist zumeist wegen Störungen genereller molekularer Funktionen wie dem Energie- oder RNA-Metabolismus oder Störungen der Mitose bedingt. Bei Embryonen, die während oder kurz nach der Implantation sterben, ist häufig infolge des Gendefektes die Verbindung zwischen Trophoektoderm und Decidua gestört, so dass keine ausreichende Versorgung des Embryos gewährleistet ist. Diese Ereignisse gehen häufig mit Fehlbildungen der extraembryonalen Gewebe einher. Embryonen mit einer gestörten Gastrulation zeigen eine normale Implantation. Die Anlage der Keimblätter ist jedoch fehlerhaft, so dass häufig Anomalien in der Mesodermformation, fehlende Blutzirkulation und Störungen in der Bildung des Primitivstreifens beobachtet werden können. Diese Embryonen weisen ab E6.5 deutliche Größenunterschiede verglichen mit wildtypischen Geschwistern auf. Gendefekte, die in einer Letalität während der frühen Organogenese resultieren, betreffen häufig Anomalien in der Ausbildung der chorioallantoiden Placenta und bedingen somit eine mangelnde Versorgung des Embryos. In der Regel ist die Ausbildung des Primitivstreifens und der Körperachsen in diesen Fällen normal. Die

Embryonen zeigen jedoch im Vergleich mit wildtypischen Geschwistern starke Entwicklungsretardierungen in Bezug auf die Größe, der Ausbildung caudaler Strukturen, der Herzdifferenzierung und des Drehprozesses. Führt der Gendefekt erst in späteren Embryonalstadien zur Letalität, so ist von Störungen während spezifischer Prozesse der Organdifferenzierung auszugehen [Review (Copp 1995)].

Um den Zeitpunkt der Letalität von *Sfrs10*$^{-/-}$-Embryonen zu determinieren, wurden sukzessiv Embryonen verschiedener Entwicklungsstadien aus *Sfrs10*$^{+/-}$-Interkreuzungen präpariert, untersucht und genotypisiert (Tabelle 3.4). Mit diesen präparativen Analysen konnten weder an E12.5 noch an E10.5 homozygote *Sfrs10-knock-out*-Embryonen detektiert werden (Abbildung 3.18, Abbildung 3.19). Bei den Präparationen beider Entwicklungsstadien fiel eine relativ hohe Anzahl an resorbierten Embryonen auf, die als Hinweis auf eine frühere Letalität von *Sfrs10*$^{-/-}$-Embryonen gewertet wurden. Eine wegen des Mangels an Sfrs10 bedingte Letalität während der späteren fetalen Entwicklung konnte mit diesen Analysen ausgeschlossen werden (Tabelle 3.4).

Die Untersuchungen von Embryonen sehr früher Entwicklungsstadien – von Morulae (E2.5) und Blastulae (E3.5) – ergaben keine Auffälligkeiten zwischen Embryonen einer Präparation. Alle untersuchten Morulae entwickelten sich *in vitro* zu Blastulae, so dass für weitere Experimente direkt Blastocysten präpariert und analysiert wurden. Hierbei waren über eingehende Genotypisierungen der Embryonen sowohl unter den *in vitro*- als auch unter den *in viv*o-differenzierten Blastulae eindeutig *Sfrs10-knock-out*-Embryonen nachweisbar. Die Genotypisierung wurde stets mit drei unabhängigen PCRs bestätigt und erst mittels Kombination der drei Ergebnisse ausgewertet. (3.4.3.1, Abbildung 3.20). Aus den Resultaten wurde geschlossen, dass der homozygote Verlust des *Sfrs10* nicht prä-implantiv, sondern erst während oder nach der Implantation (~E4.5) des Embryos zur Letalität führte.

Weitere präparative Analysen grenzten den Zeitraum der embryonalen Letalität von *Sfrs10*$^{-/-}$-Embryonen deutlich auf post-implantive Stadien ein. Mit den Präparationen von Embryonen an E9.5 konnten *Sfrs10*$^{-/-}$-Embryonen identifiziert werden. Mit Hilfe der anschließenden Analysen konnte der Genotyp der *knock-out*-Embryonen eindeutig verifiziert werden. Die *Sfrs10*$^{-/-}$-Embryonen wiesen bereits zu diesem Zeitpunkt eine sehr starke Entwicklungsretardierung auf und zeigten eine beginnende Resorbierung. Bei den wildtypischen oder heterozygoten Geschwistern hatte bereits deutlich die Organogenese (Abbildung 3.21A/B) eingesetzt. Die Somiten waren eindeutig zu erkennen, und teilweise war bei den Präparationen der Herzschlag detektierbar. Die *Sfrs10*$^{-/-}$-Embryonen hingegen waren wesentlich kleiner und zeigten keinerlei Anzeichen für eine Durchblutung oder Organ-Differenzierungen. Die Präparation dieser Emb-

ryonen gestaltete sich schwierig, da sie nur noch als Gewebe-Rudimente vorlagen, die bereits klebrig und instabil waren. Dies wies auf einen früheren Todeszeitpunkt hin. Bei einem dieser Embryonen konnten Reste der Allantois detektiert werden (Abbildung 3.21), während diese bei gleichaltrigen Geschwistern eines anderen Genotyps bereits mit dem Chorion zur Nabelschnur fusioniert war. Dies könnte auf eine mangelnde Versorgung des Embryos und eine damit bedingte Letalität hinweisen.

Weiterführende Präparationen und Analysen von Embryonen von Tag 8.5 zeigten auch in diesem Stadium bereits starke Entwicklungsretardierungen der *Sfrs10-knock-out*-Embryonen im Vergleich mit Embryonen der andereren Genotypen der gleichen Präparation. Hierbei war die Resorbierung der *Sfrs10*$^{-/-}$-Embryonen noch nicht so weit fortgeschritten wie an E9.5; dennoch waren – bis auf die extraembryonale Allantois – keine deutlichen Strukturen zu erkennen (Abbildung 3.21). Sowohl bei Untersuchungen von E8.5 als auch von E9.5 zeigten sich leichte Entwicklungsunterschiede zwischen wildtypischen und heterozygoten *Sfrs10-knock-out*-Geschwistern, die jedoch nicht mit dem Genotyp korrelierten und vielmehr normaler Bestandteil der murinen Embryonalentwicklung sind.

Mit einer Präparation und anschließenden Genotypisierungen von Embryonen an E7 konnten keine augenfälligen Unterschiede zwischen den *knock-out*-Embryonen oder Geschwistern der anderen Genotypen ausgemacht werden (Abbildung 3.23). Die Embryonen wiesen alle ähnliche Größen und Entwicklungsgrade auf. Es waren keine Anzeichen für Resorbierungen oder Retardierungen zu erkennen. Diesen Eindruck vermittelte jedoch nur ein Vergleich der Embryonen über Betrachtungen mit einem Binokular. Subtilere Unterschiede sind mit dieser Methode wegen der geringen Größe der Embryonen (~1,5 mm) und ihrem relativ undifferenzierten Status nicht feststellbar (vgl. 1.6.1).

Zusammenfassend folgt anhand der Ergebnisse der präparativen Analysen von Embryonen verschiedener Entwicklungsstadien die Annahme, dass der *knock-out* des *Sfrs10* post-implantiv zwischen E7.5 und E8.25 zur Letalität führte. Bei dieser Zeiteingrenzung sind jedoch die in der Methode zur Bestimmung des Embryonalstadiums begründeten zeitlichen Schwankungen zu berücksichtigen. Die Determination eines Embryonalstadiums erfolgte mit der Kontrolle der Vaginalpfropfe von Weibchen am Morgen nach der Verpaarung (2.10.5). Wird ein solcher *plug* detektiert, geht man vom Stadium E0.5 aus. Da bei der Embryonalentwicklung der Maus jedoch bereits einige Stunden in starken Differenzierungsunterschieden resultieren, ist diese Zeitbestimmung nur eine grobe Orientierungshilfe. Mit terminierten Verpaarungen, bei welchen Männchen und Weibchen nur für ein bis zwei Stunden zusammengebracht werden, könnte man

diese Abweichungen umgehen. Hierbei ist jedoch mit einer äußerst geringen Anzahl schwangerer Weibchen zu rechnen.
Um einen Eindruck des Sfrs10-Expressionsmusters während verschiedener Embryonalstadien zu erhalten – und somit eventuelle Rückschlüsse auf die Ursache der embryonalen Letalität ziehen zu können –, wurden immunhistologische Untersuchungen an wildtypischen Embryonen verschiedener Stadien vorgenommen. Bereits an E9.5 zeigte sich eine ubiquitäre Expression des Sfrs10-Proteins mit stärkeren Färbungen in neuronalen Bereichen (Abbildung 3.24). Die Abschätzung von Expressionsstärken ist jedoch generell mit immunhistologischen Färbungen schwierig und erlaubt keine definitiven Aussagen bezüglich der Quantitäten. Das Expressionsprofil eines Proteins hingegen kann mit dieser Methode eindeutig nachgewiesen werden. Die Eindruck der starken Sfrs10-Expression in neuronalen Geweben entspricht jedoch Kenntnissen über die Expression des humanen Homologs (Chen et al. 2003).
Da die ubiquitäre Expression von Sfrs10 an E9.5 keine Rückschlüsse auf eine Ursache des letalen Phänotyps von *Sfrs10*$^{-/-}$-Embryonen zuließ, wurden auch Embryonen früherer Entwicklungsstadien mit immunhistologischen Methoden auf die Expression des Sfrs10 geprüft. Im Rahmen dieser Untersuchungen zeigte sich bereits eine ubiquitäre Expression des Spleißfaktors um E8 und um E7 (Abbildung 3.25, Abbildung 3.26). Bei Analysen von Embryonen um E8 konnte mit den immunhistologischen Färbungen ein *Sfrs10-knock-out*-Embryo identifiziert werden. Dieser zeigte ausschließlich die Gegenfärbung von Zellkernen und Cytoplasma (GIEMSA), jedoch keine Sfrs10-spezifische Färbung. Dieser Unterschied wurde mit der deutlichen Sfrs10-Färbung im umgebenden maternalen Decidua-Gewebe besonders betont. Der Embryo zeigte keine auffälligen Anomalien, wobei – wegen der Schnitttiefe – fast ausschließlich extraembryonale Strukturen gefärbt wurden. Im Vergleich mit altersgleichen Embryonen konnten jedoch im *Sfrs10*$^{-/-}$-Embryo keine Blutzellen detektiert werden – dies könnte ein Hinweis auf eine fehlende Vaskularisierung und eine Unterversorgung des Embryos sein. Im umgebenden maternalen Decidua konnten dagegen Endothelzellen entdeckt werden (Abbildung 3.25). Mit weiteren immunhistologischen Untersuchungen dieses Embryos könnten eventuelle Fehlbildungen identifiziert werden. Hierzu wären umfassende Analysen von Präparaten möglichst vieler Schnittebenen nötig. Diese Untersuchungen sind in Vorbereitung.
Wie bereits erwähnt, wurden im Verlauf dieser Arbeit die Datenbanken aktualisiert, die auf eine Expression von Sfrs10 bereits an E6.5 im extraembryonalen Ektoderm hinweisen (MGI; *Mouse genome informatics*). Aus dieser Struktur entwickeln sich überwiegend extraembryonale Membranen, die unter anderem der Versorgung des Embryos dienen. Mit der beobachteten fehlenden Nabelschnurbildung (E9.5) (Abbildung 3.21A) und dem Mangel an Blutzellen

(Abbildung 3.25C) könnte die homozygote Deletion des *Sfrs10* wegen einer unzureichenden Versorgung zur Letalität des Embryos führen. Ob diese Phänotypen jedoch Auslöser der Letalität oder nur eine Begleiterscheinung derselben sind, muss mit weiterführenden Analysen geklärt werden. Weitere Präparationen von Embryonen verschiedener Entwicklungsstadien um E6-E8 sind bereits erfolgt. Mit der Herstellung und Untersuchung weiterer immunhistologischer Präparate und der Identifizierung mehrerer *knock-out*-Embryonen könnten Strukturen, deren Retardierung letztlich zum Tod der Embryonen führt, ergänzend analysiert werden. Interessante Aspekte könnten sich über Färbungen apoptotischer Marker wie der Caspase-3 neben den genotypisierenden Sfrs10-Färbungen ergeben.

Um der Frage einer unzureichenden Vaskularisierung von *Sfrs10*$^{-/-}$-Embryonen nachzugehen, könnten Allantois-Explantate untersucht werden. In der Allantois ist ab ~E8.5 eine deutliche Struktur von Blutgefäßen erkennbar. Bei Vergleichen der Allantois-Explantate von *knock-out*-Embryonen und Geschwistern der anderen Genotypen könnten Störungen dieser Vaskularisierung aufgezeigt werden.

Mit den geschilderten präparativen und immunhistologischen Analysen von Embryonen aus *Sfrs10*$^{+/-}$-Interkreuzungen konnte der Zeitraum der Letalität von *Sfrs10*$^{-/-}$- Embryonen auf E7.5 bis E8.25 eingegrenzt werden. Die exakte Bestimmung des wegen der Deletion des *Sfrs10*-bedingten Todeszeitpunktes ist jedoch schwierig und bedarf weiterer Untersuchungen. Infolge der ubiquitären Expression von Sfrs10 schon in frühen Entwicklungsstadien können keine Rückschlüsse auf Keimblatt- oder Gewebe-spezifische Funktionen des Spleißfaktors gezogen werden.

Mit den beschriebenen Analysen kann nicht ausgeschlossen werden, dass bei *Sfrs10*$^{-/-}$-Embryonen bereits gastrulative Prozesse gestört sind, die demzufolge in der Letalität resultieren. Da über Präparationen von E7 jedoch keine Größenunterschiede der Embryonen detektiert wurden und selbst an E9.5 noch Rudimente von *knock-out*-Embryonen präpariert werden konnten, ist eine *knock-out*-bedingte Störung der frühen Organogenese bzw. der Embryonalversorgung wahrscheinlicher.

Bisher sind nur wenige *knock-out*-Mausmodelle für Komponenten des Spleißosoms beschrieben. So führt der *knock-out* von SRp20c zur embryonalen Letalität um E3.5 (Jumaa et al. 1999), während der *knock-out* von hnRNP-C post-implantiv um ~E6.5 zum gleichen Phänotyp führt (Williamson et al. 2000). Bei Letzterem hat die Deletion anscheinend keinen Einfluss auf die Zellentwicklung *per se*, da hnRNP-C-defiziente ES-Zellen sowohl ihre Teilungsfähigkeit, als auch ihre Differenzierbarkeit behalten (Williamson et al. 2000). Ähnliche Beobachtungen

ergaben sich auch im Laufe dieser Arbeit – ein HTN-Cre vermittelter *knock-out* von *Sfrs10* in Fibroblasten hatte keinerlei Einfluss auf das proliferative Potential der Zellen (3.5.3.1, 4.4.2).

Die phänotypischen Konsequenzen eines Spleißfaktor *knock-o*uts lassen sich jedoch nicht verallgemeinern. So variiert beispielsweise der Zeitpunkt der Letalität von Embryonen mit SRp20c- oder hnRNP-C-*knock-out*, was Funktionen der Spleißfaktoren an unterschiedlichen Prozessen der Embryogenese suggeriert. Andere Spleißfaktoren können außerdem prinzipiell die Funktion eines anderen ersetzen. In C*aenorhabditis elegans* führt der RNAi-vermittelte *knock-down* des SF2/ASF-Orthologs zu einem späten embryonal letalen Phänotyp, während der *knock-down* sechs anderer SR-Proteine keine phänotypischen Konsequenzen hat. Der *knock-down* des *C. elegans* SFRS10-Orthologs *Cetra2-ß* (auch *rsp-8*) resultiert in einem komplexen Phänotyp: Hierbei wurde zum Teil die Letalität während Larvalstadien beobachtet werden, wobei die meisten Tiere jedoch adulte Entwicklungsstadien erreichten. Diese wiesen Wachstumsdefizite auf und zeigten Dysfunktionen des Darms, unterentwickelte Gonaden und – ähnlich des Tra2-Phänotyps in *Drosophila* – Sterilität (Longman et al. 2000). Die Deletion von Tra2 in *Drosophila* führt zu der Transformation von Weibchen in phänotypische Männchen, die jedoch steril sind (Baker and Ridge 1980). Trotz der möglicherweise konservierten Funktion des Sfrs10 und des *Drosophila*-Tra2 an Prozessen der Spermatogenese (1.4.3) scheint folglich die generelle Funktion des Spleißfaktors zwischen den Spezies nicht konserviert zu sein.

Einige SR-Proteine scheinen somit essentielle Funktionen einzunehmen, während andere nicht-essentielle Funktionen tragen. Einerseits könnte dies an einer redundanten Funktion anderer SR-Proteine liegen, andererseits könnten die entsprechenden SR-Proteine ausschließlich beim Spleißen nicht-essentieller Gene fungieren (Graveley 2000).

Obwohl Sfrs10 ubiquitär exprimiert wird, unterliegt die Expressionsstärke auch Regulationen während der Entwicklung (Beil et al. 1997; Chen et al. 2003; Chen et al. 2004a). So wurde eine Expressionsminderung von E15 über P0 zum adulten Tier in der Lunge und eine Expressionsverstärkung im Cerebrum gezeigt (Chen et al. 2004a). Die Bedeutung von Sfrs10 in späteren Entwicklungsstadien oder im adulten Tier könnte über weitere spezifische konditionale *knock-outs* eingängiger untersucht werden. Mit der Möglichkeit *Sfrs10* spezifisch zu deletieren ergeben sich zahlreiche Ansätze um das Wirkungsspektrum des Spleißfaktors *in vivo* zu untersuchen. So wurden in unseren Laboratorien bereits die ersten Kreuzungen der *Sfrs10*$^{FL/FL}$-Linie mit einer Nestin-Cre-Linie (Vitte et al. 2004) vorgenommen. Diese Cre-Rekombinase induziert spezifisch die Deletion eines gefloxten Allels im ZNS. Da die Expression des *Cre*-Transgens erst um E10.5 einsetzt – also nach dem Zeitpunkt der Letalität von *Sfrs10*$^{-/-}$-Embryonen – könnten auch homozygote Nachkommen dieser Verpaarungen interessante Aspekte des Sfrs10-

Wirkungsspektrums im ZNS beleuchten. Dies könnte insofern von besonderem Interesse sein, da SFRS10 in neuronalen Geweben stark exprimiert wird (Chen et al. 2003) und bei verschiedenen neuronal-spezifischen alternativen Spleißprozessen – beispielsweise dem Spleißen von Tau, FGF-2R und Glu-R B (siehe 1.4.3) – involviert zu sein scheint (Chen et al. 2004a; Chen et al. 2004b; Glatz et al. 2006; Jiang et al. 2003; Kondo et al. 2004).
Die Ergebnisse der dargestellten phänotypischen Analysen von *Sfrs10*$^{-/-}$-Embryonen deuten eine bedeutende Funktion des Spleißfaktors im RNA-Metabolismus während der frühen Embryonalentwicklung nach der Implantation an. Der phänotypische Effekt der *Sfrs10*-Deletion ist rezessiv.

4.4 Generierung von spezifischen konditionalen *Sfrs10-knock-outs*

Der frühe embryonal letale Phänotyp des ubiquitären *Sfrs10-knock-outs* schloss funktionelle Analysen des Spleißfaktors an diesen Embryonen aus. Um die Bedeutung des Sfrs10 auch im Kontext des *Smn*-Spleißens zu beleuchten, sollten spezifische Cre-induzierte Deletionen des Gens durchgeführt und untersucht werden. Einerseits wurde mit dem Einkreuzen einer *Hb9-Cre*-transgenen Mauslinie ein Motoneuronen-spezifischer *knock-out* des *Sfrs10* induziert. Anderseits wurde die HTN-Cre (Peitz et al. 2002) induzierte Deletion des gefloxten *Sfrs10*-Allels in einer zuvor etablierten murinen embryonalen Fibroblasten-Zelllinie vorgenommen.

4.4.1 Die Hb9-Cre-induzierte Deletion des *Sfrs10* in Motoneuronen

Um die Bedeutung des Sfrs10 auch in Bezug auf das *Smn*-Spleißen zu beleuchten, wurde ein Hb9-Cre-vermittelter *knock-out* des *Sfrs10* in Motoneuronen vorgenommen. Diese spezifische Deletion wurde mit Einkreuzen des *Hb9*-Transgens auf den *Sfrs10*$^{FL/FL}$-genetischen Hintergrund erreicht. Da bei der spinalen Muskelatrophie primär Motoneuronen betroffen sind, wurde ein für diesen Zelltyp spezifischer *knock-out* gewählt. Bei einer essentiellen Involvierung des Sfrs10 am Spleißen des *Smn* wäre bei den Tieren ein SMA-ähnlicher Phänotyp mit neuromotorischen Defiziten zu erwarten gewesen. Darüber hinaus wird SFRS10 in neuronalen Geweben relativ stark exprimiert (Chen et al. 2003), so dass auch andere phänotypische Konsequenzen der *Sfrs10*-Deletion nicht ausgeschlossen werden konnten.
Die Expression der Hb9-Cre-Rekombinase wurde für die Versuche zunächst über Kreuzungen der *Hb9-Cre*-Linie (Arber et al. 1999) mit einer *ROSA26/LacZ*-transgenen „Reporter“-Linie (Soriano 1999) untersucht. Die Auswertungen von X-Gal-gefärbten Geweben wiesen auf eine deutliche Expression der Hb9-Cre im Rückenmark hin. Hierbei schien die Expression nicht nur auf Motoneuronen beschränkt zu sein – auch in Teilen des Pankreas wurde eine deutliche Färbung festgestellt. Die Leber als Kontrollgewebe hingegen zeigte keine blaue Färbung (Abbildung 3.28). Auch mittels *whole mount*-Färbungen an Embryonen von E10.5 und E13.5 konnte eine deutliche Expression der Hb9-Cre im Rückenmark verfolgt werden (Abbildung 3.29). Die Färbungen spiegelten das Expressionsprofil der Hb9-Cre wider. Die Ergebnisse bestätigen das für Hb9 bekannte Expressionsprofil in Motoneuronen, einigen Interneuronen und in Teilen des Pankreas (Arber et al. 1999).
Mit Einkreuzen des *Hb9-Cre*-Transgens auf den genetischen *Sfrs10*$^{FL/FL}$-Hintergrund wurde der Motoneuronen-spezifische *knock-out* des Spleißfaktors induziert. Wegen der Restriktion der

Sfrs10-Deletion auf bestimmte somatische Zellen wurde diese nicht vererbt, so dass das *Hb9-Cre*-Transgen für alle Analysen präsent sein musste.

Die Deletion des *Sfrs10* konnte bereits mit Hilfe einfacher Genotypisierungen mittels PCR- und *Southern*-Analysen gezeigt werden (Abbildung 3.30). Hierbei wurde DNA aus dem Pankreas oder einem Schwanzspitzenbiopsat – in welchem Rückenmarkanteile vorliegen – verwendet, wobei sich sowohl das Fragment des gefloxten als auch des deletierten Allels amplifizieren ließen. Diese Doppelbanden wurden wegen der verschiedenen Zellpopulationen in den Biopsaten detektiert – der Hb9-Cre-vermittelte *Sfrs10-knock-out* war auf Motoneuronen, die nur einen geringen Teil des Schwanzspitzenmaterials ausmachen, und auf Teile des Pankreas beschränkt.

Neben der Genotypisierung auf DNA-Ebene sollte die Motoneuronen-spezifische *Sfrs10*-Deletion auch auf Expressionsebene gezeigt werden. Dazu wurde aus dem Rückenmark adulter *Sfrs10*$^{FL/FL}$*; Hb9*-Cre- und *Sfrs*$^{FL/FL}$-Tiere cDNA gewonnen; die *Sfrs10*-Transkripte wurden mittels *Realtime*-PCRs quantifiziert. Da sich unter diesen Tieren Schwankungen in der *Sfrs10*-Expression zeigten, die nicht mit dem Genotyp korrelierten, wurde in folgenden Untersuchungen embryonales Rückenmarkmaterial verwendet. Der Anteil von Motoneuronen im adulten Rückenmark liegt nur bei 3-5%, während er im embryonalen Rückenmark bei 10-15% liegt. Doch auch bei der Quantifizierung der *Sfrs10*-Transkripte an embryonalem Material konnte bei *Sfrs10*$^{FL/FL}$*; Hb9-Cre*-Embryonen keine eindeutige Tendenz zu einer geringeren Expression des Spleißfaktors festgestellt werden (Abbildung 3.32A.). Auch die Bestimmung der *Sfrs10*-Transkriptmenge relativ zu dem Motoneuronen-spezifischen Transkript *Islet1/2* ließ keine Rückschlüsse auf eine geringere Expression zu (Abbildung 3.32B). Aus diesem Ergebnis wurde gefolgert, dass die Motoneuronen-spezifische Deletion von *Sfrs10* wegen der geringen *knock-out*-Zellpopulation nicht über eine Quantifizierung von Transkripten des kompletten Rückenmarks zu zeigen war.

Über immunhistologische Untersuchungen von Rückenmarkschnitten adulter *Sfrs10*$^{FL/FL}$*; Hb9-Cre*- und *Sfrs*$^{FL/FL}$-Kontroll-Tiere konnte schließlich die Motoneuronen-spezifische Deletion des *Sfrs10* an *Sfrs10*$^{FL/FL}$*; Hb9-Cre*-Tieren gezeigt werden. Hierbei wurde neben dem Antikörper für Sfrs10 ein solcher für die Cholinacetyltransferase (ChAT) benutzt, deren Färbung als Marker für Motoneuronen verwendet wurde. Neben eindeutig Sfrs10-negativen Motoneuronen im Vorderhorn des Rückenmarks fielen in den *Sfrs10*$^{FL/FL}$*; Hb9-Cre*-Tieren Zellen von gleicher Größe mit einem deutlichen Signal für Sfrs10 auf (Abbildung 3.33). Hierbei ist nicht auszuschließen, dass es sich bei diesen Zellen auch um andere als Motoneuronen handelte, da der ChAT-Antikörper alle cholinergen Neuronen färbt. Die Größe und Lage der geschilderten Sfrs10-positiven Zellen sprechen wiederum für eine motoneuronale Identität. Da die Realisie-

rung der konditionalen Deletion des *Sfrs10* mit den Ergebnissen des ubiquitären *knock-outs* (3.4) und des HTN-Cre-vermittelten *knock-outs* (3.5.3) deutlich gezeigt wurde, ist hierbei nicht von einem Defekt des gefloxten Locus auszugehen. Die *knock-out*-bedingte Generierung eines verkürzten Sfrs10-Proteinproduktes und dessen Detektion bei *Sfrs10*$^{FL/FL}$*, Hb9-Cre*-Mäusen sind jedoch relativ unwahrscheinlich. Der Antikörper für Sfrs10 bindet die erste RS-Domäne des Spleißfaktors, die von den Exons 3 und 4 codiert wird. Der *Sfrs10-knock-out* beruht auf der Deletion des Exons 4, so dass das Epitop eines potentiell generierten Peptids extrem verkürzt wäre. Zudem wurde an Rückenmarkschnitten von *Sfrs10*$^{FL/FL}$*, Hb9-Cre*-Tieren eindeutig eine größere Anzahl an Sfrs10-negativen als an Sfrs10-positiven Motoneuronen identifiziert. Ferner konnte in *Western Blot*-Analysen mit *Sfrs10*$^{-/-}$-MEFs kein verkürztes Sfrs10-Proteinfragment detektiert werden (siehe Kapitel 3.5.3 und Abbildung 3.35). Auch diese Beobachtungen sprechen gegen die Generierung und Detektion eines verkürzten Sfrs10-Proteinproduktes in *Sfrs10*$^{FL/FL}$*; Hb9-Cre*-Tieren.

Da die Sfrs10-negativen Motoneuronen ausschließlich in *Sfrs10*$^{FL/FL}$; *Hb9-Cre*-Tieren, nicht jedoch in *Sfrs10*$^{FL/FL}$-Tieren detektiert wurden, ist nicht von unspezifischen Ergebnissen auszugehen. Eine Ursache für eine unvollständige Deletion des *Sfrs10* in Motoneuronen könnte in der Effizienz der Hb9-Cre-vermittelten Rekombination liegen. Hierbei wurde das Expressionsprofil dieser Rekombinase zwar mit den Untersuchungen an „Reporter“-Mäusen gezeigt, eine Expressionseffizienz wird jedoch mit dieser Methode nicht deutlich. Hierbei könnte die Rekombinase zwar in jeder Zelle exprimiert, nicht aber auch eine vollständige Deletion in jeder Zelle induzieren. Darüber hinaus könnte die Zugänglichkeit des zu deletierenden Locus in diesem Zusammenhang wichtig sein. Dies dürfte jedoch angesichts der erfolgreichen konditionalen *knock-outs* (3.4, 3.5.3) von untergeordneter Bedeutung sein.

Mittels weiterer immunhistologischer Untersuchungen mit spezifischen Motoneuronenmarkern wie Hb9 oder Islet1/2 soll die Identität dieser potentiell Sfrs10-exprimierenden Motoneuronen an *Sfrs10*$^{FL/FL}$*; Hb9-Cre*-Tieren geklärt werden. Hierbei sind auch Analysen von Motoneuronenkulturen der Tiere denkbar – eine Technik, die zurzeit in unseren Laboratorien etabliert wird.

Die *Sfrs10*$^{FL/FL}$*; Hb9-Cre*-Mäuse zeigten keine phänotypischen Auffälligkeiten. Die Tiere waren lebensfähig, fertil und hatten die übliche Lebenserwartung. Eine Neuronen-Übersichtsfärbung mit Kresylviolett (Nissl-Färbung) verschiedener Rückenmarkareale von *Sfrs10*$^{FL/FL}$*; Hb9-Cre*- und Kontroll-Mäusen zeigte keine Unterschiede (Abbildung 3.31).

Bei den verschiedenen SMA-Mäusen sind bereits sehr früh nach der Geburt deutliche motorische Einschränkungen zu beobachten. Da die *Sfrs10*$^{FL/FL}$*; Hb9-Cre*-Tiere keinerlei Anzeichen

auf verminderte motorische Fähigkeiten aufwiesen, wurde auf ausgedehnte motorische Tests verzichtet.

Die ersten immunhistologischen Färbungen von Sfrs10 und Smn zeigten keinerlei Unterschiede in der Smn-Expression von Sfrs10-negativen Motoneuronen. Dieses vorläufige Ergebnis muss zwar mit weiteren Experimenten verifiziert werden, weist jedoch auch auf eine mangelnde Korrelation der Sfrs10-Deletion und der *Smn*-Expression *in vivo* hin – ein Ergebnis, das sich auch bei *in vitro*-Experimenten mit *Sfrs10*-deletierten MEFs andeutete (3.5.3).

Obwohl SFRS10 in neuronalen Geweben stark exprimiert wird und *in vitro* die neuronale Differenzierung zu induzieren vermag (Chen et al. 2003; Chen et al. 2004a), konnten keinerlei Beeinträchtigungen auf Grund der Motoneuronen-spezifischen Deletion des Spleißfaktors gezeigt werden. Hierbei könnten auch kompensatorische Effekte anderer Spleißfaktoren oder benachbarter Sfrs10-positiver Neuronen von Bedeutung sein. Desgleichen sollte die potentiell unvollständige *Sfrs10*-Deletion in Motoneuronen wegen mangelnder phänotypischer Konsequenzen berücksichtigt und mit weiteren *in vivo*-Untersuchungen verifiziert werden.

Um die Bedeutung des Sfrs10 beim Spleißen des *SMN2* zu analysieren, könnten Experimente mit SMA-Mäusen von Interesse sein. Wie gezeigt wurde, geht in Valproat-behandelten humanen Zellen ein Anstieg des VL-*SMN*-Transkriptes mit einem Anstieg an *SFRS10* einher (Brichta et al. 2003). Somit könnten Versuche an $Smn^{-/-}$; $SMN2^{+/+}$-Mäusen mit HDAC-Inhibitoren wie Valproat und einer Quantifizierung von *Sfrs10*-Transkripten neue Erkenntnisse über eine Korrelation bringen. Erste Behandlungen von SMA-Mäusen mit dem HDAC-Inhibitoren Trichostatin A (Kernochan et al. 2005) und Valproat (Tsai et al. 2008) resultierten in einer deutlichen Heraufregulation des VL-*SMN* vom *SMN2*-Gen – bei diesen Untersuchungen wurde Sfrs10 jedoch nicht quantifiziert.

Die Motoneuronen-spezifische Deletion des *Sfrs10* in einer $Smn^{-/-}$; $SMN2^{+/+}$; $Sfrs10^{FL/FL}$; *Hb9-Cre*-Mauslinie und die anschließende Analyse des Phänotyps oder von kultivierten Zellen der Tiere könnten weitere Erkenntnisse der Sfrs10-Funktionen im Kontext des alternativen Spleißens von *SMN* liefern. Die ersten Kreuzungen zur Generierung einer $Smn^{-/-}$; $SMN2^{+/+}$; $Sfrs10^{FL/FL}$-Linie sind in unseren Laboratorien bereits erfolgreich durchgeführt worden. Wegen der komplexen allelischen Komposition von einem homozygoten *knock-out*, einem homozygot-gefloxten Allel, dem *SMN2*-Transgen und einem weiteren *Cre*-Transgen wird bis zur erfolgreichen Generierung einer solchen Linie allerdings noch einige Zeit vergehen.

4.4.2 Die HTN-Cre-induzierte Deletion des *Sfrs10* in murinen embryonalen Fibroblasten

Wegen der mangelnden neuromotorischen Konsequenzen auf den Phänotyp von Tieren mit einer *Sfrs10*-Deletion in Motoneuronen (4.4.1) und der für die Analysen schweren Zugänglichkeit der *Sfrs10*-deletierten Zellen wurde eine HTN-Cre-vermittelte *Sfrs10*-Deletion in murinen embryonalen Fibroblasten (MEFs) vorgenommen.

Die *in vitro*-Deletion des *Sfrs10* erfolgte in *Sfrs10*$^{FL/FL}$-Fibroblasten, die mittels Präparation von Embryonen an E13.5 generiert wurden (3.5.3). Die Embryonen stammten aus Interkreuzungen von *Sfrs10*$^{FL/FL}$-Tieren, so dass die MEFs das *Sfrs10* homzygot gefloxt trugen. Über eine Behandlung mit HTN-Cre (Peitz et al. 2002) wurde die Deletion des Allels induziert. Der Nachweis dieser Deletion konnte bereits 48 h nach der Behandlung eindeutig über Genotypisierungen gezeigt werden (Abbildung 3.34).

Die Quantifizierungen der Proteinmengen von drei unabhängigen Versuchen zeigten kontinuierlich sinkende Sfrs10-Konzentrationen nach 48 bzw. 96 h und ein vollständiges Fehlen des Proteins nach sechs Tagen (Abbildung 3.35). Hierin spiegelt sich die Halbwertszeit des Proteins in der Zelle wider. Der HTNC-vermittelte *knock-out* von *Sfrs10* war somit auf Proteinebene vollständig. Die HTN-Cre penetriert für gewöhnlich nicht alle Zellen, so dass verbleibende wildtypische Zellen die *knock-out*-Zellen wegen proliferativer Vorteile überwachsen können. Im Vergleich mit *mock*-behandelten Zellen zeigten sich jedoch keine phänotypischen Konsequenzen der *Sfrs10*-Deletion an MEFs. Die *Sfrs10*$^{-/-}$-Zellen wiesen ein normales proliferatives Potential und keine offensichtlichen strukturellen Veränderungen auf.

Über Quantifizierungen der Transkripte von HTN-Cre- und *mock*-behandelten *Sfrs10*$^{FL/FL}$-MEFs konnte bereits nach 48 h ein drastischer Rückgang der *Sfrs10*-Transkripte auf 3-4% gezeigt werden (Abbildung 3.36A). Auch mit diesen Ergebnissen spiegelt sich die hohe Effizienz der Cre-Behandlung. Die geringe – mittels der *Realtime*-PCR detektierte – *Sfrs10*-Transkriptmenge ist in Bezug auf die Funktion des Spleißfaktors wohl zu vernachlässigen, da mit den *Western*-Analysen kein Sfrs10-Protein detektiert werden konnte.

Den Auswirkungen der *Sfrs10*-Deletion auf das Spleißen des *Smn* wurden mit Quantifizierungen der Smn-Proteinkonzentrationen und der *Smn*-Transkriptmengen nachgegangen (Abbildung 3.35, Abbildung 3.36B). Hierbei konnte innerhalb beider Untersuchungen im Vergleich mit *mock*-behandelten Zellen kein signifikanter Expressionsunterschied festgestellt werden. In früheren Analysen wurde gezeigt, dass reduzierte SMN-Konzentrationen auf Proteinebene auch niedrigere SFRS10-Konzentrationen bedingen (Helmken et al. 2003). In Bezug auf das murine Homolog konnte mit den Untersuchungen an *Sfrs10*$^{-/-}$-MEFs die Korrelation zwischen den Proteinkonzentrationen nicht festgestellt werden.

Die Maus weist nur das zu *SMN1* äquivalente *Smn* auf. Bisherige Untersuchungen mit *Northern Blot*-Analysen wiesen nicht auf die Generierung von *SmnΔ7*-Transkripten von diesem Gen hin (DiDonato et al. 1997). Bei einer Mutagenese des *Smn*-SE1 mit der für das *SMN2* charakteristischen C- zu T-Transition wird allerdings in Mäusen ebenfalls ein aberrantes Transkript ohne Exon 7 generiert (DiDonato et al. 2001). Die revertierende Wirkung des SFRS10 in Bezug auf die Spleißprodukte des *SMN2* wurde bereits gezeigt (Hofmann et al. 2000). Darum wurde die – wegen der induzierten *Sfrs10*-Deletion-bedingte – Generierung einer aberranten murinen Spleißform des *Smn* in Betracht gezogen. Über die Generierung von *SmnΔ7*-spezifischen Primern und PCR-Analysen konnten auch von verschiedenen Geweben wildtypischer Mäuse geringe Mengen eines *SmnΔ7*-entsprechenden Transkripts detektiert werden. In den *Sfrs10*$^{-/-}$-MEFs konnte ein signifikanter 3-4facher Anstieg dieses aberranten Transkripts bereits 48 h nach der HTN-Cre-Behandlung festgestellt werden (Abbildung 3.36C). Hierbei war jedoch sowohl in *mock*- als auch in HTN-Cre-behandelten Zellen ein relativ geringes Expressionslevel dieses Transkripts im Vergleich mit dem VL-*Smn* zu vermerken. Es ist nicht gänzlich auszuschließen, dass das hier beschriebene *SmnΔ7*-Transkript wegen unspezifischer Bindungen der Primer an das VL-*Smn* amplifiziert wurde. Da jedoch drei voneinander unabhängige Primerkombinationen zu einem *SmnΔ7*-Amplifikat der erwarteten Größe führten (Abbildung 3.37), ist eine schwache Expression des aberranten Transkripts vom *Smn*-Gen wahrscheinlicher. Der Anstieg der aberranten *SmnΔ7*-Transkripte in *Sfrs10*$^{-/-}$-MEFs weist auf eine Funktion des Sfrs10 im korrekten Spleißen des Exons 7 hin. Der SE2, an welchen SFRS10 bindet und der das korrekte Spleißen von *SMN2*-Transkripten vermittelt (siehe auch Abbildung 1.5), ist in der Maus konserviert. Da die Deletion des Spleißfaktors jedoch keine Auswirkungen auf die VL-*Smn*- und die Smn-Protein-Expression als solche hatte, scheint Sfrs10 für das korrekte Spleißen des VL-*Smn* nicht essentiell zu sein. Dieser Eindruck könnte jedoch auch wegen kompensatorischer Effekte anderer Spleißfaktoren wie z.B. SF2/ASF bedingt sein – dies verdeutlicht die komplexen regulativen Mechanismen eines *in vivo* oder *in vitro*-Systems. Nach der Behandlung von humanen Fibroblastenkulturen mit Valproat wurde ein 2-5facher Anstieg des VL-*SMN2*-Transkripts gezeigt, der mit einem 3-4fachen Anstieg von *SFRS10* bedingt zu sein schien. Bei einer Valproat-Behandlung von organotypischen *hippocampalen* Hirnschnittkulturen der Ratte hingegen konnte trotz steigender Smn-Konzentrationen nur ein geringfügiger Anstieg von Sfrs10 beobachet werden. Die Konzentration von SF2/ASF hingegen stieg eklatant an (Brichta et al., 2003). Diese Beobachtungen könnten auf unterschiedliche Mechanismen der humanen bzw. murinen *SMN*-Transkriptregulationen in Bezug auf SFRS10 hinweisen. Hierbei ist jedoch

auch der *in vitro*-Kontext in dem hier untersuchten Zellsystem zu berücksichtigen, der eventuell die *in vivo* Situation nicht vollständig reflektiert.

Auch wenn die Deletion des *Sfrs10* den Expressionsanstieg des aberranten *SmnΔ7* bedingte, deuten die geschilderten *in vitro*-Analysen von MEFs keine Korrelation des Sfrs10 auf das Spleißen oder die Expression von *Smn per se* an. Die funktionelle Bedeutung des Spleißfaktors auf das Spleißen von *SMN2* könnte mit Analysen von $Smn^{-/-}$; $SMN2^{+/+}$; $Sfrs10^{FL/FL}$-Mäusen weitergehend untersucht werden, da das humane SFRS10 und das murine Sfrs10 auf Proteinebene 100% identisch sind. Hierbei könnte die *Sfrs10-Deletion* unter Verwendung spezifischer Cre-Linien induziert und die Konsequenzen des *knock-outs* in Bezug auf den Phänotyp der SMA-Mäuse untersucht werden. Für diese Versuche müssten Gewebe-spezifische Cre-Linien – wie beispielsweise die Motoneuronen-spezifische Hb9-Cre (3.5.2) – verwendet werden, da die ubiquitäre homozygote Deletion des *Sfrs10* zur embryonalen Letalität führt (3.4.3). Auch die Generierung von entsprechenden MEFs und die HTNC-induzierte Deletion des *Sfrs10* sind denkbar. Die ersten Kreuzungen zur Generierung einer solchen Linie sind – wie erwähnt (4.4.1) – bereits erfolgt.

Mit weiteren Analysen von *Sfrs10*-deletierten MEFs im Vergleich mit $Sfrs10^{FL/FL}$-MEFs könnten jedoch mittels der *microarray*-Technik Sfrs10-abhängige alternative Transkripte oder kompensierende Spleißfaktoren identifiziert werden.

Da die *Sfrs10*-deletierten MEFs keine phänotypischen Auffälligkeiten zeigten, ist von einer nicht-essentiellen Funktion des Spleißfaktors in diesem Zelltyp auszugehen. Diese Beobachtungen stehen im Gegensatz zu dem drastischen Phänotyp einer ubiquitären *Sfrs10*-Deletion (3.4.3). Ferner weisen die Ergebnisse trotz der ubiquitären Expression des Spleißfaktors (3.4.3.2) auf unterschiedlich essentielle Funktionen in verschiedenen Zelltypen und Geweben bzw. Entwicklungsstadien hin.

4.5 Ausblick

Obwohl im Rahmen dieser Arbeit nur eine indirekte Korrelation zwischen der Konzentration von Sfrs10 und dem Spleißen von *Smn* gezeigt werden konnte, ist der Spleißfaktor weiterhin einer der bedeutungsvollsten Kandidaten zur Modulation von *SMN2*-Transkripten und somit auch des SMA-Phänotyps.

Da die Maus keine *SMN2*-Kopie besitzt, bleibt die Generierung und phänotypische Charakterisierung einer *SFRS10*-transgenen *Smn*$^{-/-}$*; SMN2*$^{+/+}$-Maus eine äußerst interessante Herausforderung, um den Effekt des Spleißfaktors auf das Spleißen des *SMN2* zu untersuchen. Dies könnte über die verbesserten Techniken zur Generierung und Etablierung von transgenen Linien z.B. mit einer konditionalen Expression des *SFRS10*-Transgens unter Kontrolle des *ROSA26*-Promotors gelingen.

Umgekehrt ist auch eine negative phänotypische Veränderung von SMA-Tieren bei Deletion des Spleißfaktors denkbar. Die ersten Kreuzungen der *Sfrs10*$^{FL/FL}$; *Hb9-Cre*-Linie auf einen *Smn*$^{-/-}$*; SMN2*$^{+/+}$-genetischen Hintergrund sind in unseren Laboratorien bereits erfolgreich durchgeführt worden. Die Relevanz des Sfrs10 in Bezug auf das alternative Spleißen des *SMN2* könnte somit *in vivo* über die Konsequenzen der *Sfrs10*-Deletion auf den SMA-Phänotyp analysiert werden Hierbei wären auch spezifische Sfrs10-Deletionen mittels anderer Cre-Linien möglich. Die phänotypischen Analysen dieser Tiere könnten weitere Hinweise auf die Bedeutung des Spleißfaktors im alternativen Spleißen von *SMN2* oder auch auf andere modulierende Faktoren geben. Mit der gegenwärtigen Etablierung von Motoneuronenkulturen in unseren Laboratorien könnten diese Mäuse untersucht und zudem die phänotypischen Analysen von *Sfrs10*$^{FL/FL}$*; Hb9-Cre*-Tieren ergänzt werden.

Die Analysen des letalen Phänotyps an *Sfrs10*$^{-/-}$-Embryonen sollen mit weiteren immunhistologischen Untersuchungen komplettiert werden. Dafür wurden bereits mehrere Embryonen präpariert. Mit der Identifizierung mehrerer *knock-out*-Embryonen und weiterführenden immunhistologischen Analysen könnten weitere Aspekte der Sfrs10-Funktion während der frühen Embryogenese beleuchtet werden. Hierbei könnten auch Experimente mit Färbungen von Apoptose-Markern wie der Caspase-3 von Interesse sein, um die embryonalen Strukturen zu identifizieren, in welchen die Deletion des Spleißfaktors primär zu diesem drastischen Phänotyp führt. Die Letalität auf Grund einer fehlenden Vaskularisierung des Embryos könnte über Allantois-Explantate *ex vivo* untersucht werden.

Unter dem Aspekt neuronaler Funktionen des Sfrs10 wurden bereits erste Kreuzungen der *Sfrs10*$^{FL/FL}$-Linie mit einer *Nestin-Cre*-transgenen Linie unternommen, womit letztlich ein

ZNS-spezifischer *knock-out* des Spleißfaktors generiert werden soll. Da diese Cre-Rekombinase die Deletion erst um ~E9.5 – also nach dem Zeitpunkt der embryonalen Letalität des ubiquitären *Sfrs10-knock-out*s – induziert, könnten Aspekte der neuronal-spezifischen Funktionen von Sfrs10 in späteren Stadien der Embryonalentwicklung oder in adulten Tieren untersucht werden.

Obwohl bei einem für die männliche Keimbahn-spezifischen *knock-out* des *Sfrs10* mit der Sterilität der Männchen zu rechnen ist, könnten die Analysen solcher Tiere Aufschluss über Testis-spezifische alternative Spleißprozesse und die Funktion von Sfrs10 während der Spermatogenese geben.

Um eine generelle Erkenntnis des Sfrs10-Wirkungsspektrums zu erhalten, könnten zudem mit der *microarray*-Technik von Sfrs10 alternativ regulierte Transkripte, interagierende und/oder regulierende Faktoren identifiziert werden. Hierbei wäre auch die Identifikation von kompensatorischen Spleißfaktoren von Interesse. Als Ausgangsmaterial für diese Analysen wären HTN-Cre-induzierte MEFs oder Gewebe der spezifischen *in vivo Sfrs10-knock-outs* denkbar.

Mit der erfolgreichen Generierung des *Sfrs10*-Mausmodells und der Möglichkeit der konditionalen Deletion des *Sfrs10* bieten sich zahlreiche Ansatzpunkte, um weitere funktionelle Analysen des Spleißfaktors zu verfolgen.

5. Zusammenfassungen

5.1 Zusammenfassung

SFRS10 gehört zu der Familie der – für die Spleißreaktion nicht-essentiellen – SR-*related*-Spleißfaktoren. Über autoregulative Prozesse und die Regulation des Phosphorylierungsstatus wird die Konzentration an funktionellem SFRS10 in Zellen im Gleichgewicht gehalten. SFRS10 ist an der Regulation verschiedener alternativer Spleißprozesse involviert, wobei die Selektion alternativer Spleißstellen von seiner Konzentration abhängt. Eine Beteiligung des Proteins an der Generierung alternativer Spleißprodukte wurde z.B. in der männlichen Keimbahn und bei neuronal-spezifischen Vorgängen gezeigt. Darüber hinaus fördert SFRS10 über die Bindung eines GA-reichen ***e****xonic* ***s****plicing* ***e****nhancers* (ESE) im zentralen Teil des *SMN*-Exons 7 dessen Einschluss in die *SMN*-RNA. Der funktionelle Verlust des *SMN1*-Gens verursacht die autosomal-rezessiv vererbte spinale Muskelatrophie (SMA). Diese neuromuskuläre Erkrankung führt zur Degeneration von α-Motoneuronen im Rückenmark. Der Schweregrad der SMA korreliert mit der Kopienzahl eines zweiten Gens – des *SMN2*. Wegen einer translational stillen Mutation in Exon 7 werden von *SMN2* ~90% aberrante und nur ~10% korrekt gespleißte Volllängetranskripte (VL) generiert. Diese Exon 7 enthaltenden Transkripte codieren – wie auch die von *SMN1* generierten – das funktionelle SMN-Protein. Der Spleißfaktor SFRS10 vermag *in vitro* eine bis zu 80%ige Revertierung des *SMN2*-Spleißmusters zu induzieren. Daher ist SFRS10 ein viel versprechender Kandidat für eine *in vivo*-Modulation der *SMN2*-RNA-Prozessierung. Mäuse tragen nur das dem *SMN1* homologe Gen *Smn*, dessen homozygoter Verlust in einer frühen embryonalen Letalität resultiert. Bei Expression des humanen *SMN2*-Transgens zeigen $Smn^{-/-}$-Mäuse einen SMA-ähnlichen Phänotyp.

Um das modulierende Potential des Spleißfaktors auf den SMA-Phänotyp *in vivo* zu analysieren, sollte ein *SFRS10*-transgenes $Smn^{-/-}$; $SMN2^{+/+}$-Mausmodell generiert werden. Untersuchungen an einer bestehenden *SFRS10*-transgenen Linie ergaben jedoch eine fehlende neuronal-spezifische Expression des *SFRS10*-Transgens, so dass auf weitere Kreuzungen und Analysen verzichtet wurde.

Da nur wenig über Sfrs10 und dessen generelles Wirkungsspektrum bekannt war, sollten *in vivo* – auch in Hinblick auf das Spleißen des murine *Smn* – die phänotypischen Konsequenzen von *Sfrs10-knock-outs* untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden konditionale Cre-loxP-vermittelte *Sfrs10-knock-out*-Mausmodelle generiert und charakterisiert. Der ubiquitäre heterozygote *knock-out* des *Sfrs10* blieb – trotz 30-40%iger Reduktion der Sfrs10-Proteinexpression – ohne ausgeprägte phänotypische Konsequenzen. $Sfrs10^{+/-}$-Männchen wiesen jedoch eine Rever-

tierung des Sfrs10-Phosphorylierungsmusters in Testis auf. Dieses Ergebnis weist auf regulative Prozesse zur Kompensation des heterozygoten *Sfrs10*-Verlustes und auf eine wichtige Funktion des Proteins in diesem Gewebe hin.

Der ubiquitäre homozygote *Sfrs10-knock-out* resultierte in der frühen embryonalen Letalität zwischen E7.5 und E8.25. In frühen Embryonalstadien (E3.5) konnten *Sfrs10*$^{-/-}$-Embryonen identifiziert werden, die keine phänotypischen Auffälligkeiten zeigten. Homozygote *Sfrs10-knock-out*-Embryonen an E9.5 und an E8.5 dagegen wiesen starke Entwicklungsretardierungen im Vergleich mit Geschwistern anderer Genotypen auf und zeigten bereits erste Zeichen einer Resorbierung. Der drastische Phänotyp von *Sfrs10*$^{-/-}$-Embryonen deutet eine essentielle Funktion des Spleißfaktors Sfrs10 während der Embroygenese in post-implantiven Stadien an. Diese Vermutung wird mit dem Nachweis einer ubiquitären Expression im Mausembryo bereits um E7 gestützt.

Da das Sfrs10-abhängige *Smn*-Spleißen und die daraus resultierenden Phänotypen untersucht werden sollten, wurde ein Hb9-Cre-vermittelter Motoneuronen-spezifischer *Sfrs10-knock-out* vorgenommen. Tiere mit dieser *Sfrs10*-Deletion zeigten keine phänotypischen Auffälligkeiten. Mit immunhistologischen Untersuchungen wurde die Sfrs10-Deletion nachgewiesen, wobei unklar bleibt, ob alle Motoneuronen von dieser betroffen waren. Die Phänotypisierung solcher Tiere wird mittels weiterer Analysen fortgeführt.

Über die Behandlung von murinen embryonalen Fibroblasten (MEFs; *Sfrs10*$^{FL/FL}$) mit rekombinanter HTN-Cre wurde die *Sfrs10*-Deletion *in vitro* induziert und deren Wirkung auf das Spleißen des *Smn* untersucht. Über spezifische Primerkombinationen konnte die Generierung eines bisher nicht beschriebenen *SmnΔ7*-Transkripts vom *Smn*-Gen gezeigt werden, dessen Expression, verglichen mit dem des VL-*Smn*, gering war. Die *Sfrs10*-Deletion bewirkte einen 3-4fachen Anstieg dieses Transkripts. Quantifizierungen der VL-*Smn*-Transkripte und der Smn-Proteinmenge in *Sfrs10*-deletierten MEFs zeigten jedoch keine *Sfrs10*-vermittelten Abweichungen in der Smn-Expression. Diese Ergebnisse sprechen für eine nicht-essentielle Funktion des Sfrs10 bezüglich des *Smn*-Spleißens.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten auf eine essentielle Bedeutung des Sfrs10 während der frühen Embryonalentwicklung hin, während der Spleißfaktor in anderen Geweben und Zellen wie Fibroblasten und Motoneuronen auch in Bezug auf das VL-*Smn*-Spleißen eine nicht-essentielle Funktion zu haben scheint.

Mit der Generierung eines konditional induzierbaren *Sfrs10-knock-out*-Mausmodells wurde ein *in vivo*-System etabliert, mit dem weiterhin auch in Hinblick auf das Spleißen des *SMN* zahlreiche funktionelle Analysen realisierbar sind.

5.2 Summary

The SR-related splicing factor SFRS10 is like other members of this family non-essential for the splicing reaction. The SFRS10 concentration in cells is controlled by autoregulative and phosphorylation-dependent processes. Changes in SFRS10 concentration affect splice site selection. SFRS10 has been shown to be involved in alternative splicing in the male germ line as well as in neuronal-specific RNA-processes. Furthermore, SFRS10 facilitates the inclusion of exon 7 into the *SMN* mRNA by binding to a GA-rich **e**xonic **s**plicing **e**nhancer (ESE) localised in the central part of exon 7. The functional loss of the *SMN1* gene causes autosomal recessively inherited spinal muscular atrophy (SMA). SMA is a neurodegenerative disorder caused by a progressive loss of α-motor neurons in the anterior horns of the spinal cord. The phenotypic severity correlates with the copy number of a second gene – *SMN2*. Due to a translationally silent mutation in exon 7, ~90% of the transcripts generated from *SMN2* lack this exon while only 10% of the transcripts are correctly spliced. The correctly spliced full-length transcripts (FL) encode – like the ones generated from *SMN1* – functional SMN protein. Overexpression of the splicing factor SFRS10 restores the splicing pattern of the *SMN2 in vitro*. Due to that effect SFRS10 is a promising candidate for an *in vivo* modulation of *SMN* RNA processing. Mice possess only one *Smn* copy the loss of which results in early embryonic lethality. This phenotype is partly rescued by expression of the human *SMN2*. These mice reveal an SMA-like phenotype.

To analyse the modulating potential of SFRS10 on the SMA phenotype *in vivo*, an *SFRS10* transgenic mouse model had previously been generated in our laboratory in order to finally create an $Smn^{-/-}$; $SMN2^{+/+}$; *SFRS10* transgenic mouse. The neuronal-specific expression of *SFRS10* was investigated in spinal cord of adult mice and embryos. However, transgene expression could not be detected in these mice. Therefore, no further cross-breedings or analyses were performed.

Little is known about Sfrs10 protein and its entire spectrum of action. To investigate Sfrs10 function *in vivo* – also with regard to *Smn*-splicing – a knockout for the murine orthologue *Sfrs10* via the Cre/loxP-system was designed, generated and characterised.

Initially, a ubiquitous Sfrs10 deletion was performed and characterised. Even though heterozygous *Sfrs10* knockout mice exhibited reduced protein levels, no obvious phenotype in these animals was observed. However, $Sfrs10^{+/-}$ males showed a reversion of Sfrs10 phosphorylation pattern in testis, indicating that regulative mechanisms counteract to overcome the heterozygous loss of *Sfrs10*. Furthermore, it points towards an essential role of the splicing factor in this tissue. The ubiquitous homozygous loss of *Sfrs10* resulted in embryonic lethality around E7.5

and E8.25. Early *Sfrs10*$^{-/-}$ embryos at E3.5 showed no phenotypical abnormalities as compared to embryos of other genotypes. Homozygous *Sfrs10* knockout embryos at E8.5 and E9.5 revealed developmental retardation and signs of resorption. The dramatic impact of *Sfrs10*$^{-/-}$ loss suggests an essential role of the splicing factor Sfrs10 during early embryogenesis in post implantation stages. This assumption is further supported by the observation of a ubiquitous Sfrs10 expression already at E7.

To investigate the influence of Sfrs10 on *Smn* splicing and on the neuronal phenotypes, a motor neuron specific *Sfrs10* deletion was performed via crossbreeds *Sfrs10*$^{FL/FL}$-mice with an Hb9-Cre-strain. Mice homozygous for the floxed *Sfrs10*, carrying the *Hb9*-transgene showed no phenotypical abnormalities. The motor neuron specific Sfrs10 deletion was shown via immunohistological analysis, whereas it remained unclear whether Sfrs10 was deleted in all motor neurons. Additional analyses of the phenotype of these mice are in progress.

The potential of Sfrs10 on *Smn* splicing was assessed *in vitro* in murine embryonic fibroblasts (MEFS; *Sfrs10*$^{FL/FL}$) using recombinant HTN-Cre in order to delete *Sfrs10.* Via specific primer combinations a so far not described splicing isoform of *Smn* – *SmnΔ7* – was detected. Expression levels of this isoform were relatively low as compared with FL-*Smn* transcripts, but *Sfrs10* deletion in MEFs resulted in 3-4fold increase in *SmnΔ7.* Quantification of FL-*Smn* transcripts and Smn protein levels revealed no changes in Smn concentrations mediated by *Sfrs10* deletion, indicating a non-essential role of Sfrs10 in *Smn* splicing.

Taken together, the results of this work indicate an essential role of Sfrs10 during early embryonic development whereas the splicing factor seems to be dispensable in certain tissues and cells such as fibroblasts and motor neurons also with regard to full-length *Smn* splicing.

The generation of a conditionally inducible *Sfrs10* knockout mouse model offers various perspectives to analyse Sfrs10 function also with regard to *SMN* splicing *in vivo.*

6. Teilveröffentlichungen der Arbeit

6.1 Gedruckte Posterbeiträge

Mende, Y., Hofmann, Y., Anadol, E., Jablonka, S., Sendtner, M.; Wirth, B.: Htra2-ß1 – a splicing modulator of *SMN2* transcripts: functional studies in transgenic and knock-out mice. Medgen, Band 17; abstract P204; GfH-Tagung, Halle, 2005.

Mende, Y., Hofmann, Y., Anadol, E., Jablonka, S., Sendtner, M.; Wirth, B.: Htra2-ß1 – a splicing modulator of *SMN2* transcripts: functional studies in transgenic and knock-out mice. Medgen, Band 18, abstract P225; GfH-Tagung, Heidelberg, 2006.

Mende, Y., Hofmann, Y., Anadol, E., Jablonka, S., Sendtner, M.; Wirth, B.: Htra2-ß1 – a splicing modulator of *SMN2* transcripts: functional studies in transgenic and *knock-out* mice.
10th Annual International Spinal Muscular Atrophy Research Group Meeting,
Montreal 9-11.06.2006.

Mende, Y.; Jakubik, M. Anadol, E.; Wirth, B.: SFRS10 – a splicing regulator of *SMN2* transcripts: functional studies in transgenic and knock-out mice.
Medgen Band 19, abstract P232; GfH-Tagung, Bonn, 2007.

Jakubik, M.; **Mende Y.;** Schoenen, F.: Functional analysis of the transcription factor-like nuclear regulator (TFNR) protein by generating conditional knock-out mice.
Medgen Band 19, abstract P280; GfH-Tagung, Bonn, 2007.

Mende, Y.; Jakubik, M. Anadol, E.; Wirth, B.: SFRS10 – a splicing modulator of *SMN2* transcripts: Generation of a conditional *knock-out* mouse.
11th Annual International Spinal Muscular Atrophy Research Group Meeting, Schaumburg 21-23.06.2007.

7. Literaturverzeichnis

Abremski K, Hoess R (1984) Bacteriophage P1 site-specific recombination. Purification and properties of the Cre recombinase protein. J Biol Chem 259: 1509-14

Abremski K, Hoess R, Sternberg N (1983) Studies on the properties of P1 site-specific recombination: evidence for topologically unlinked products following recombination. Cell 32: 1301-11

Andreadis A (2005) Tau gene alternative splicing: expression patterns, regulation and modulation of function in normal brain and neurodegenerative diseases. Biochim Biophys Acta 1739: 91-103

Andreadis A, Brown WM, Kosik KS (1992) Structure and novel exons of the human tau gene. Biochemistry 31: 10626-33

Andreassi C, Angelozzi C, Tiziano FD, Vitali T, De Vincenzi E, Boninsegna A, Villanova M, Bertini E, Pini A, Neri G, Brahe C (2004) Phenylbutyrate increases SMN expression in vitro: relevance for treatment of spinal muscular atrophy. Eur J Hum Genet 12: 59-65

Arber S, Han B, Mendelsohn M, Smith M, Jessell TM, Sockanathan S (1999) Requirement for the homeobox gene Hb9 in the consolidation of motor neuron identity. Neuron 23: 659-74

Baker BS (1989) Sex in flies: the splice of life. Nature 340: 521-4

Baker BS, Ridge KA (1980) Sex and the single cell. I. On the action of major loci affecting sex determination in Drosophila melanogaster. Genetics 94: 383-423

Behringer ANMGKVR (2003) Manipulating the Mouse Embryo, A Laboratory Manual

Beil B, Screaton G, Stamm S (1997) Molecular cloning of htra2-beta-1 and htra2-beta-2, two human homologs of tra-2 generated by alternative splicing. DNA Cell Biol 16: 679-90

Belote JM, Baker BS (1983) The dual functions of a sex determination gene in Drosophila melanogaster. Dev Biol 95: 512-7

Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res 7: 1513-23

Black DL (2000) Protein diversity from alternative splicing: a challenge for bioinformatics and post-genome biology. Cell 103: 367-70

Blencowe BJ (2000) Exonic splicing enhancers: mechanism of action, diversity and role in human genetic diseases. Trends Biochem Sci 25: 106-10

Blencowe BJ, Bowman JA, McCracken S, Rosonina E (1999) SR-related proteins and the processing of messenger RNA precursors. Biochem Cell Biol 77: 277-91

Boguski MS (2002) Comparative genomics: the mouse that roared. Nature 420: 515-6

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72: 248-54

Bradley A, Evans M, Kaufman MH, Robertson E (1984) Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. Nature 309: 255-6

Brichta L, Hofmann Y, Hahnen E, Siebzehnrubl FA, Raschke H, Blumcke I, Eyupoglu IY, Wirth B (2003) Valproic acid increases the SMN2 protein level: a well-known drug as a potential therapy for spinal muscular atrophy. Hum Mol Genet 12: 2481-9

Brichta L, Holker I, Haug K, Klockgether T, Wirth B (2006) In-vivo activation of SMN in SMA carriers and patients treated with valproate. Ann Neurol 59: DOI:10.1002/ana.20836

Brzustowicz LM, Allitto BA, Matseoane D, Theve R, Michaud L, Chatkupt S, Sugarman E, Penchaszadeh GK, Suslak L, Koenigsberger MR, et al. (1994) Paternal isodisomy for chromosome 5 in a child with spinal muscular atrophy. Am J Hum Genet 54: 482-8

Budowle B, Chakraborty R, Giusti AM, Eisenberg AJ, Allen RC (1991) Analysis of the VNTR locus D1S80 by the PCR followed by high-resolution PAGE. Am J Hum Genet 48: 137-44

Burglen L, Lefebvre S, Clermont O, Burlet P, Viollet L, Cruaud C, Munnich A, Melki J (1996) Structure and organization of the human survival motor neurone (SMN) gene. Genomics 32: 479-82

Burset M, Seledtsov IA, Solovyev VV (2000) Analysis of canonical and non-canonical splice sites in mammalian genomes. Nucleic Acids Res 28: 4364-75

Campbell NA (1997) Biologie

Carrel TL, McWhorter ML, Workman E, Zhang H, Wolstencroft EC, Lorson C, Bassell GJ, Burghes AH, Beattie CE (2006) Survival motor neuron function in motor axons is independent of functions required for small nuclear ribonucleoprotein biogenesis. J Neurosci 26: 11014-22

Cartegni L, Hastings ML, Calarco JA, de Stanchina E, Krainer AR (2006) Determinants of exon 7 splicing in the spinal muscular atrophy genes, SMN1 and SMN2. Am J Hum Genet 78: 63-77

Cartegni L, Krainer AR (2002) Disruption of an SF2/ASF-dependent exonic splicing enhancer in SMN2 causes spinal muscular atrophy in the absence of SMN1. Nat Genet 30: 377-84

Chandler SD, Mayeda A, Yeakley JM, Krainer AR, Fu XD (1997) RNA splicing specificity determined by the coordinated action of RNA recognition motifs in SR proteins. Proc Natl Acad Sci U S A 94: 3596-601

Chang JG, Hsieh-Li HM, Jong YJ, Wang NM, Tsai CH, Li H (2001) Treatment of spinal muscular atrophy by sodium butyrate. Proc Natl Acad Sci U S A 98: 9808-13

Charlet BN, Logan P, Singh G, Cooper TA (2002) Dynamic antagonism between ETR-3 and PTB regulates cell type-specific alternative splicing. Mol Cell 9: 649-58

Chen Q, Baird SD, Mahadevan M, Besner-Johnston A, Farahani R, Xuan J, Kang X, Lefebvre C, Ikeda JE, Korneluk RG, MacKenzie AE (1998) Sequence of a 131-kb region of 5q13.1 containing the spinal muscular atrophy candidate genes SMN and NAIP. Genomics 48: 121-7

Chen X, Guo L, Lin W, Xu P (2003) Expression of Tra2beta isoforms is developmentally regulated in a tissue- and temporal-specific pattern. Cell Biol Int 27: 491-6

Chen X, Huang J, Li J, Han Y, Wu K, Xu P (2004a) Tra2betal regulates P19 neuronal differentiation and the splicing of FGF-2R and GluR-B minigenes. Cell Biol Int 28: 791-9

Chen XH, Li J, Lin WM, Wu K, Xu P (2004b) [Function of Tra2beta1 proteins in the splicing of neural-specific genes]. Shi Yan Sheng Wu Xue Bao 37: 109-17

Choi T, Huang M, Gorman C, Jaenisch R (1991) A generic intron increases gene expression in transgenic mice. Mol Cell Biol 11: 3070-4

Cifuentes-Diaz C, Frugier T, Tiziano FD, Lacene E, Roblot N, Joshi V, Moreau MH, Melki J (2001) Deletion of murine SMN exon 7 directed to skeletal muscle leads to severe muscular dystrophy. J Cell Biol 152: 1107-14

Cobben JM, van der Steege G, Grootscholten P, de Visser M, Scheffer H, Buys CH (1995) Deletions of the survival motor neuron gene in unaffected siblings of patients with spinal muscular atrophy. Am J Hum Genet 57: 805-8

Collins CA, Guthrie C (2000) The question remains: is the spliceosome a ribozyme? Nat Struct Biol 7: 850-4

Coovert DD, Le TT, McAndrew PE, Strasswimmer J, Crawford TO, Mendell JR, Coulson SE, Androphy EJ, Prior TW, Burghes AH (1997) The survival motor neuron protein in spinal muscular atrophy. Hum Mol Genet 6: 1205-14

Copp AJ (1995) Death before birth: clues from gene knockouts and mutations. Trends Genet 11: 87-93

Cowper AE, Caceres JF, Mayeda A, Screaton GR (2001) Serine-arginine (SR) protein-like factors that antagonize authentic SR proteins and regulate alternative splicing. J Biol Chem 276: 48908-14

Cox MM (1983) The FLP protein of the yeast 2-microns plasmid: expression of a eukaryotic genetic recombination system in Escherichia coli. Proc Natl Acad Sci U S A 80: 4223-7

Crawford TO, Pardo CA (1996) The neurobiology of childhood spinal muscular atrophy. Neurobiol Dis 3: 97-110

Cusin V, Clermont O, Gerard B, Chantereau D, Elion J (2003) Prevalence of SMN1 deletion and duplication in carrier and normal populations: implication for genetic counselling. J Med Genet 40: E39

Dandolo L, Stewart CL, Mattei MG, Avner PR (1993) Inactivation of an X-linked transgene in murine extraembryonic and adult tissues. Development 118: 641-9

Daoud R, Da Penha Berzaghi M, Siedler F, Hubener M, Stamm S (1999) Activity-dependent regulation of alternative splicing patterns in the rat brain. Eur J Neurosci 11: 788-802

Daoud R, Mies G, Smialowska A, Olah L, Hossmann KA, Stamm S (2002) Ischemia induces a translocation of the splicing factor tra2-beta 1 and changes alternative splicing patterns in the brain. J Neurosci 22: 5889-99

Dauwalder B, Mattox W (1998) Analysis of the functional specificity of RS domains in vivo. Embo J 17: 6049-60

Delacourte A, Buee L (1997) Normal and pathological Tau proteins as factors for microtubule assembly. Int Rev Cytol 171: 167-224

Delanote V, Vandekerckhove J, Gettemans J (2005) Plastins: versatile modulators of actin organization in (patho)physiological cellular processes. Acta Pharmacol Sin 26: 769-79

DiDonato CJ, Brun T, Simard LR (1999) Complete nucleotide sequence, genomic organization, and promoter analysis of the murine survival motor neuron gene (Smn). Mamm Genome 10: 638-41

DiDonato CJ, Chen XN, Noya D, Korenberg JR, Nadeau JH, Simard LR (1997) Cloning, characterization, and copy number of the murine survival motor neuron gene: homolog of the spinal muscular atrophy-determining gene. Genome Res 7: 339-52

DiDonato CJ, Lorson CL, De Repentigny Y, Simard L, Chartrand C, Androphy EJ, Kothary R (2001) Regulation of murine survival motor neuron (Smn) protein levels by modifying Smn exon 7 splicing. Hum Mol Genet 10: 2727-36

Dreyfuss G, Kim VN, Kataoka N (2002) Messenger-RNA-binding proteins and the messages they carry. Nat Rev Mol Cell Biol 3: 195-205

Dreyfuss G, Matunis MJ, Pinol-Roma S, Burd CG (1993) hnRNP proteins and the biogenesis of mRNA. Annu Rev Biochem 62: 289-321

Duncan PI, Howell BW, Marius RM, Drmanic S, Douville EM, Bell JC (1995) Alternative splicing of STY, a nuclear dual specificity kinase. J Biol Chem 270: 21524-31

Eggan K, Rode A, Jentsch I, Samuel C, Hennek T, Tintrup H, Zevnik B, Erwin J, Loring J, Jackson-Grusby L, Speicher MR, Kuehn R, Jaenisch R (2002) Male and female mice derived from the same embryonic stem cell clone by tetraploid embryo complementation. Nat Biotechnol 20: 455-9

Eggert C, Chari A, Laggerbauer B, Fischer U (2006) Spinal muscular atrophy: the RNP connection. Trends Mol Med

Eissa NT, Strauss AJ, Haggerty CM, Choo EK, Chu SC, Moss J (1996) Alternative splicing of human inducible nitric-oxide synthase mRNA. tissue-specific regulation and induction by cytokines. J Biol Chem 271: 27184-7

Evans JJ, Bozdech MJ (1981) Hypokalemia in nonblastic chronic myelogenous leukemia. Arch Intern Med 141: 786-7

Evans MJ, Kaufman MH (1981) Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. Nature 292: 154-6

Fan L, Simard LR (2002) Survival motor neuron (SMN) protein: role in neurite outgrowth and neuromuscular maturation during neuronal differentiation and development. Hum Mol Genet 11: 1605-14

Farley FW, Soriano P, Steffen LS, Dymecki SM (2000) Widespread recombinase expression using FLPeR (flipper) mice. Genesis 28: 106-10

Faustino NA, Cooper TA (2003) Pre-mRNA splicing and human disease. Genes Dev 17: 419-37

Fedorov LM, Haegel-Kronenberger H, Hirchenhain J (1997) A comparison of the germline potential of differently aged ES cell lines and their transfected descendants. Transgenic Res 6: 223-31

Feinberg AP, Vogelstein B (1984) "A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity". Addendum. Anal Biochem 137: 266-7

Feldkotter M, Schwarzer V, Wirth R, Wienker TF, Wirth B (2002) Quantitative analyses of SMN1 and SMN2 based on real-time lightCycler PCR: fast and highly reliable carrier testing and prediction of severity of spinal muscular atrophy. Am J Hum Genet 70: 358-68

Fischer U, Liu Q, Dreyfuss G (1997) The SMN-SIP1 complex has an essential role in spliceosomal snRNP biogenesis. Cell 90: 1023-9

Folger KR, Wong EA, Wahl G, Capecchi MR (1982) Patterns of integration of DNA microinjected into cultured mammalian cells: evidence for homologous recombination between injected plasmid DNA molecules. Mol Cell Biol 2: 1372-87

Frugier T, Tiziano FD, Cifuentes-Diaz C, Miniou P, Roblot N, Dierich A, Le Meur M, Melki J (2000) Nuclear targeting defect of SMN lacking the C-terminus in a mouse model of spinal muscular atrophy. Hum Mol Genet 9: 849-58

Fu XD (2004) Towards a splicing code. Cell 119: 736-8

Furman E, Glitz DG (1995) Purification of the spliceosome A-complex and its visualization by electron microscopy. J Biol Chem 270: 15515-22

Futcher AB (1988) The 2 micron circle plasmid of Saccharomyces cerevisiae. Yeast 4: 27-40

Gavrilina TO, McGovern VL, Workman E, Crawford TO, Gogliotti RG, DiDonato CJ, Monani UR, Morris GE, Burghes AH (2008) Neuronal SMN expression corrects spinal muscular atrophy in severe SMA mice while muscle-specific SMN expression has no phenotypic effect. Hum Mol Genet 17: 1063-75

Ge H, Manley JL (1990) A protein factor, ASF, controls cell-specific alternative splicing of SV40 early pre-mRNA in vitro. Cell 62: 25-34

Ge H, Zuo P, Manley JL (1991) Primary structure of the human splicing factor ASF reveals similarities with Drosophila regulators. Cell 66: 373-82

Gennarelli M, Lucarelli M, Capon F, Pizzuti A, Merlini L, Angelini C, Novelli G, Dallapiccola B (1995) Survival motor neuron gene transcript analysis in muscles from spinal muscular atrophy patients. Biochem Biophys Res Commun 213: 342-8

Glatz DC, Rujescu D, Tang Y, Berendt FJ, Hartmann AM, Faltraco F, Rosenberg C, Hulette C, Jellinger K, Hampel H, Riederer P, Moller HJ, Andreadis A, Henkel K, Stamm S (2006) The alternative splicing of tau exon 10 and its regulatory proteins CLK2 and TRA2-BETA1 changes in sporadic Alzheimer's disease. J Neurochem 96: 635-44

Gordon JW, Scangos GA, Plotkin DJ, Barbosa JA, Ruddle FH (1980) Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. Proc Natl Acad Sci U S A 77: 7380-4

Gossler A, Doetschman T, Korn R, Serfling E, Kemler R (1986) Transgenesis by means of blastocyst-derived embryonic stem cell lines. Proc Natl Acad Sci U S A 83: 9065-9

Gottlicher M, Minucci S, Zhu P, Kramer OH, Schimpf A, Giavara S, Sleeman JP, Lo Coco F, Nervi C, Pelicci PG, Heinzel T (2001) Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. Embo J 20: 6969-78

Graveley BR (2000) Sorting out the complexity of SR protein functions. Rna 6: 1197-211

Graveley BR, Maniatis T (1998) Arginine/serine-rich domains of SR proteins can function as activators of pre-mRNA splicing. Mol Cell 1: 765-71

Gu H, Zou YR, Rajewsky K (1993) Independent control of immunoglobulin switch recombination at individual switch regions evidenced through Cre-loxP-mediated gene targeting. Cell 73: 1155-64

Hahnen E, Eyupoglu IY, Brichta L, Haastert K, Tränkle C, Siebzehnrübl FA, Riessland M, Hölker I, Claus P, Romstöck J, Buslei R, Wirth B, Blümcke I (2006) *In vitro* and *ex vivo* evaluation of second-generation histone deacetylase inhibitors for the treatment of spinal muscular atrophy. J Neurochem: 10.1111/j.1471-4159.2006.03868.x

Hahnen E, Forkert R, Marke C, Rudnik-Schoneborn S, Schonling J, Zerres K, Wirth B (1995) Molecular analysis of candidate genes on chromosome 5q13 in autosomal recessive spinal muscular atrophy: evidence of homozygous deletions of the SMN gene in unaffected individuals. Hum Mol Genet 4: 1927-33

Hamilton DL, Abremski K (1984) Site-specific recombination by the bacteriophage P1 lox-Cre system. Cre-mediated synapsis of two lox sites. J Mol Biol 178: 481-6

Hanamura A, Caceres JF, Mayeda A, Franza BR, Jr., Krainer AR (1998) Regulated tissue-specific expression of antagonistic pre-mRNA splicing factors. Rna 4: 430-44

Harrison PM, Kumar A, Lang N, Snyder M, Gerstein M (2002) A question of size: the eukaryotic proteome and the problems in defining it. Nucleic Acids Res 30: 1083-90

Hartmann AM, Rujescu D, Giannakouros T, Nikolakaki E, Goedert M, Mandelkow EM, Gao QS, Andreadis A, Stamm S (2001) Regulation of alternative splicing of human tau exon 10 by phosphorylation of splicing factors. Mol Cell Neurosci 18: 80-90

Helmken C, Hofmann Y, Schoenen F, Oprea G, Raschke H, Rudnik-Schoneborn S, Zerres K, Wirth B (2003) Evidence for a modifying pathway in SMA discordant families: reduced SMN level decreases the amount of its interacting partners and Htra2-beta1. Hum Genet 114: 11-21

Helmken C, Wirth B (2000) Exclusion of Htra2-beta1, an up-regulator of full-length SMN2 transcript, as a modifying gene for spinal muscular atrophy. Hum Genet 107: 554-8

Hodges MD, Vieira H, Gregory-Evans K, Gregory-Evans CY (2002) Characterization of the genomic and transcriptional structure of the CRX gene: substantial differences between human and mouse. Genomics 80: 531-42

Hoffman PN, Cleveland DW, Griffin JW, Landes PW, Cowan NJ, Price DL (1987) Neurofilament gene expression: a major determinant of axonal caliber. Proc Natl Acad Sci U S A 84: 3472-6

Hofmann Y, Lorson CL, Stamm S, Androphy EJ, Wirth B (2000) Htra2-beta 1 stimulates an exonic splicing enhancer and can restore full-length SMN expression to survival motor neuron 2 (SMN2). Proc Natl Acad Sci U S A 97: 9618-23

Hofmann Y, Wirth B (2002) hnRNP-G promotes exon 7 inclusion of survival motor neuron (SMN) via direct interaction with Htra2-beta1. Hum Mol Genet 11: 2037-49

Hsieh-Li HM, Chang JG, Jong YJ, Wu MH, Wang NM, Tsai CH, Li H (2000) A mouse model for spinal muscular atrophy. Nat Genet 24: 66-70

Huang LC, Wood EA, Cox MM (1991) A bacterial model system for chromosomal targeting. Nucleic Acids Res 19: 443-8

Jablonka S, Karle K, Sandner B, Andreassi C, von Au K, Sendtner M (2006) Distinct and overlapping alterations in motor and sensory neurons in a mouse model of spinal muscular atrophy. Hum Mol Genet 15: 511-8

Jablonka S, Schrank B, Kralewski M, Rossoll W, Sendtner M (2000) Reduced survival motor neuron (Smn) gene dose in mice leads to motor neuron degeneration: an animal model for spinal muscular atrophy type III. Hum Mol Genet 9: 341-6

Jiang Z, Tang H, Havlioglu N, Zhang X, Stamm S, Yan R, Wu JY (2003) Mutations in tau gene exon 10 associated with FTDP-17 alter the activity of an exonic splicing enhancer to interact with Tra2 beta. J Biol Chem 278: 18997-9007

Jumaa H, Wei G, Nielsen PJ (1999) Blastocyst formation is blocked in mouse embryos lacking the splicing factor SRp20. Curr Biol 9: 899-902

Jurica MS, Moore MJ (2003) Pre-mRNA splicing: awash in a sea of proteins. Mol Cell 12: 5-14

Kaiser AD, Hogness DS (1960) The transformation of Escherichia coli with deoxyribonucleic acid isolated from bacteriophage lambda-dg. J Mol Biol 2: 392-415

Kashima T, Manley JL (2003) A negative element in SMN2 exon 7 inhibits splicing in spinal muscular atrophy. Nat Genet 34: 460-3

Kato T, Ahmed M, Yamamoto T, Takahashi H, Oohara M, Ikeda T, Aida Y, Katsuki M, Arakawa Y, Shikata T, Esumi M (1996) Inactivation of hepatitis C virus cDNA transgene by hypermethylation in transgenic mice. Arch Virol 141: 951-8

Kaufman MH, Bard JBL (1999) The Anatomical Basis of Mouse Development

Kaufmann MH (1992) The Atlas of Mouse Developent

Kernochan LE, Russo ML, Woodling NS, Huynh TN, Avila AM, Fischbeck KH, Sumner CJ (2005) The role of histone acetylation in SMN gene expression. Hum Mol Genet

Kiernan AE, Erven A, Voegeling S, Peters J, Nolan P, Hunter J, Bacon Y, Steel KP, Brown SD, Guenet JL (2002) ENU mutagenesis reveals a highly mutable locus on mouse Chromosome 4 that affects ear morphogenesis. Mamm Genome 13: 142-8

Kilby NJ, Snaith MR, Murray JA (1993) Site-specific recombinases: tools for genome engineering. Trends Genet 9: 413-21

Kisseberth WC, Brettingen NT, Lohse JK, Sandgren EP (1999) Ubiquitous expression of marker transgenes in mice and rats. Dev Biol 214: 128-38

Kondo S, Yamamoto N, Murakami T, Okumura M, Mayeda A, Imaizumi K (2004) Tra2 beta, SF2/ASF and SRp30c modulate the function of an exonic splicing enhancer in exon 10 of tau pre-mRNA. Genes Cells 9: 121-30

Kontgen F, Suss G, Stewart C, Steinmetz M, Bluethmann H (1993) Targeted disruption of the MHC class II Aa gene in C57BL/6 mice. Int Immunol 5: 957-64

Krainer AR, Mayeda A, Kozak D, Binns G (1991) Functional expression of cloned human splicing factor SF2: homology to RNA-binding proteins, U1 70K, and Drosophila splicing regulators. Cell 66: 383-94

Kramer A (1996) The structure and function of proteins involved in mammalian pre-mRNA splicing. Annu Rev Biochem 65: 367-409

Ladd AN, Cooper TA (2002) Finding signals that regulate alternative splicing in the post-genomic era. Genome Biol 3: reviews0008

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-5

Lakso M, Sauer B, Mosinger B, Jr., Lee EJ, Manning RW, Yu SH, Mulder KL, Westphal H (1992) Targeted oncogene activation by site-specific recombination in transgenic mice. Proc Natl Acad Sci U S A 89: 6232-6

Le TT, Pham LT, Butchbach ME, Zhang HL, Monani UR, Coovert DD, Gavrilina TO, Xing L, Bassell GJ, Burghes AH (2005) SMNDelta7, the major product of the centromeric survival motor neuron (SMN2) gene, extends survival in mice with spinal muscular atrophy and associates with full-length SMN. Hum Mol Genet 14: 845-57

Lefebvre S, Burglen L, Reboullet S, Clermont O, Burlet P, Viollet L, Benichou B, Cruaud C, Millasseau P, Zeviani M, et al. (1995) Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. Cell 80: 155-65

Lefebvre S, Burlet P, Liu Q, Bertrandy S, Clermont O, Munnich A, Dreyfuss G, Melki J (1997) Correlation between severity and SMN protein level in spinal muscular atrophy. Nat Genet 16: 265-9

Lettmann C, Schmitz B, Doerfler W (1991) Persistence or loss of preimposed methylation patterns and de novo methylation of foreign DNA integrated in transgenic mice. Nucleic Acids Res 19: 7131-7

Li H, Arber S, Jessell TM, Edlund H (1999) Selective agenesis of the dorsal pancreas in mice lacking homeobox gene Hlxb9. Nat Genet 23: 67-70

Liu Q, Dreyfuss G (1996) A novel nuclear structure containing the survival of motor neurons protein. Embo J 15: 3555-65

Longman D, Johnstone IL, Caceres JF (2000) Functional characterization of SR and SR-related genes in Caenorhabditis elegans. Embo J 19: 1625-37

Lorson CL, Androphy EJ (2000) An exonic enhancer is required for inclusion of an essential exon in the SMA-determining gene SMN. Hum Mol Genet 9: 259-65

Lorson CL, Hahnen E, Androphy EJ, Wirth B (1999) A single nucleotide in the SMN gene regulates splicing and is responsible for spinal muscular atrophy. Proc Natl Acad Sci U S A 96: 6307-11

Lorson CL, Strasswimmer J, Yao JM, Baleja JD, Hahnen E, Wirth B, Le T, Burghes AH, Androphy EJ (1998) SMN oligomerization defect correlates with spinal muscular atrophy severity. Nat Genet 19: 63-6

Ma H, Wang Y, Mi Z, Wu Y, Zhao P, Zhao S, Jiang M, Li Y (1999) [Study of NAIP gene in spinal muscular atrophy]. Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi 16: 97-8

Madhani HD, Guthrie C (1994) Randomization-selection analysis of snRNAs in vivo: evidence for a tertiary interaction in the spliceosome. Genes Dev 8: 1071-86

Mansour SL, Thomas KR, Capecchi MR (1988) Disruption of the proto-oncogene int-2 in mouse embryo-derived stem cells: a general strategy for targeting mutations to non-selectable genes. Nature 336: 348-52

Marth JD (1996) Recent advances in gene mutagenesis by site-directed recombination. J Clin Invest 97: 1999-2002

Martin GR (1981) Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A 78: 7634-8

Matsuo N, Ogawa S, Imai Y, Takagi T, Tohyama M, Stern D, Wanaka A (1995) Cloning of a novel RNA binding polypeptide (RA301) induced by hypoxia/reoxygenation. J Biol Chem 270: 28216-22

Mattox W, Baker BS (1991) Autoregulation of the splicing of transcripts from the transformer-2 gene of Drosophila. Genes Dev 5: 786-96

Mayeda A, Krainer AR (1992) Regulation of alternative pre-mRNA splicing by hnRNP A1 and splicing factor SF2. Cell 68: 365-75

Mayeda A, Munroe SH, Caceres JF, Krainer AR (1994) Function of conserved domains of hnRNP A1 and other hnRNP A/B proteins. Embo J 13: 5483-95

McAndrew PE, Parsons DW, Simard LR, Rochette C, Ray PN, Mendell JR, Prior TW, Burghes AH (1997) Identification of proximal spinal muscular atrophy carriers and patients by analysis of SMNT and SMNC gene copy number. Am J Hum Genet 60: 1411-22

Meister G, Buhler D, Laggerbauer B, Zobawa M, Lottspeich F, Fischer U (2000) Characterization of a nuclear 20S complex containing the survival of motor neurons (SMN) protein and a specific subset of spliceosomal Sm proteins. Hum Mol Genet 9: 1977-86

Meister G, Buhler D, Pillai R, Lottspeich F, Fischer U (2001) A multiprotein complex mediates the ATP-dependent assembly of spliceosomal U snRNPs. Nat Cell Biol 3: 945-9

Meister G, Eggert C, Fischer U (2002) SMN-mediated assembly of RNPs: a complex story. Trends Cell Biol 12: 472-8

Meister G, Fischer U (2002) Assisted RNP assembly: SMN and PRMT5 complexes cooperate in the formation of spliceosomal UsnRNPs. Embo J 21: 5853-63

Merendino L, Guth S, Bilbao D, Martinez C, Valcarcel J (1999) Inhibition of msl-2 splicing by Sex-lethal reveals interaction between U2AF35 and the 3' splice site AG. Nature 402: 838-41

Misteli T, Caceres JF, Spector DL (1997) The dynamics of a pre-mRNA splicing factor in living cells. Nature 387: 523-7

Modrek B, Resch A, Grasso C, Lee C (2001) Genome-wide detection of alternative splicing in expressed sequences of human genes. Nucleic Acids Res 29: 2850-9

Monani UR, Lorson CL, Parsons DW, Prior TW, Androphy EJ, Burghes AH, McPherson JD (1999) A single nucleotide difference that alters splicing patterns distinguishes the SMA gene SMN1 from the copy gene SMN2. Hum Mol Genet 8: 1177-83

Monani UR, Pastore MT, Gavrilina TO, Jablonka S, Le TT, Andreassi C, DiCocco JM, Lorson C, Androphy EJ, Sendtner M, Podell M, Burghes AH (2003) A transgene carrying an A2G missense mutation in the SMN gene modulates phenotypic severity in mice with severe (type I) spinal muscular atrophy. J Cell Biol 160: 41-52

Monani UR, Sendtner M, Coovert DD, Parsons DW, Andreassi C, Le TT, Jablonka S, Schrank B, Rossol W, Prior TW, Morris GE, Burghes AH (2000) The human centromeric survival motor neuron gene (SMN2) rescues embryonic lethality in Smn(-/-) mice and results in a mouse with spinal muscular atrophy. Hum Mol Genet 9: 333-9

Moore MJ, Sharp PA (1993) Evidence for two active sites in the spliceosome provided by stereochemistry of pre-mRNA splicing. Nature 365: 364-8

Moorhead GB, Trinkle-Mulcahy L, Ulke-Lemee A (2007) Emerging roles of nuclear protein phosphatases. Nat Rev Mol Cell Biol 8: 234-44

Mourelatos Z, Abel L, Yong J, Kataoka N, Dreyfuss G (2001) SMN interacts with a novel family of hnRNP and spliceosomal proteins. Embo J 20: 5443-52

Muller W, Kuhn R, Rajewsky K (1991) Major histocompatibility complex class II hyperexpression on B cells in interleukin 4-transgenic mice does not lead to B cell proliferation and hypergammaglobulinemia. Eur J Immunol 21: 921-5

Munsat TL, Davies KE (1992) International SMA consortium meeting. (26-28 June 1992, Bonn, Germany). Neuromuscul Disord 2: 423-8

Nagoshi RN, McKeown M, Burtis KC, Belote JM, Baker BS (1988) The control of alternative splicing at genes regulating sexual differentiation in D. melanogaster. Cell 53: 229-36

Nathans D, Smith HO (1975) Restriction endonucleases in the analysis and restructuring of dna molecules. Annu Rev Biochem 44: 273-93

Nayler O, Cap C, Stamm S (1998) Human transformer-2-beta gene (SFRS10): complete nucleotide sequence, chromosomal localization, and generation of a tissue-specific isoform. Genomics 53: 191-202

Neuenkirchen N, Chari A, Fischer U (2008) Deciphering the assembly pathway of Sm-class U snRNPs. FEBS Lett 582: 1997-2003

Neumann E, Schaefer-Ridder M, Wang Y, Hofschneider PH (1982) Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. Embo J 1: 841-5

Newman AJ (1994) Pre-mRNA splicing. Curr Opin Genet Dev 4: 298-304

Nilsen TW (2002) The spliceosome: no assembly required? Mol Cell 9: 8-9

Nissim-Rafinia M, Aviram M, Randell SH, Shushi L, Ozeri E, Chiba-Falek O, Eidelman O, Pollard HB, Yankaskas JR, Kerem B (2004) Restoration of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator function by splicing modulation. EMBO Rep 5: 1071-7

Novoyatleva T, Heinrich B, Tang Y, Benderska N, Butchbach ME, Lorson CL, Lorson MA, Ben-Dov C, Fehlbaum P, Bracco L, Burghes AH, Bollen M, Stamm S (2008) Protein phosphatase 1 binds to the RNA recognition motif of several splicing factors and regulates alternative pre-mRNA processing. Hum Mol Genet 17: 52-70

O'Gorman S, Dagenais NA, Qian M, Marchuk Y (1997) Protamine-Cre recombinase transgenes efficiently recombine target sequences in the male germ line of mice, but not in embryonic stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A 94: 14602-7

Oprea GE, Krober S, McWhorter ML, Rossoll W, Muller S, Krawczak M, Bassell GJ, Beattie CE, Wirth B (2008) Plastin 3 is a protective modifier of autosomal recessive spinal muscular atrophy. Science 320: 524-7

Orban PC, Chui D, Marth JD (1992) Tissue- and site-specific DNA recombination in transgenic mice. Proc Natl Acad Sci U S A 89: 6861-5

Palmiter RD, Brinster RL (1986) Germ-line transformation of mice. Annu Rev Genet 20: 465-99

Palmiter RD, Brinster RL, Hammer RE, Trumbauer ME, Rosenfeld MG, Birnberg NC, Evans RM (1982) Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. Nature 300: 611-5

Parsons DW, McAndrew PE, Monani UR, Mendell JR, Burghes AH, Prior TW (1996) An 11 base pair duplication in exon 6 of the SMN gene produces a type I spinal muscular atrophy (SMA) phenotype: further evidence for SMN as the primary SMA-determining gene. Hum Mol Genet 5: 1727-32

Pasman Z, Garcia-Blanco MA (1996) The 5' and 3' splice sites come together via a three dimensional diffusion mechanism. Nucleic Acids Res 24: 1638-45

Peitz M, Pfannkuche K, Rajewsky K, Edenhofer F (2002) Ability of the hydrophobic FGF and basic TAT peptides to promote cellular uptake of recombinant Cre recombinase: a tool for efficient genetic engineering of mammalian genomes. Proc Natl Acad Sci U S A 99: 4489-94

Pellizzoni L, Charroux B, Dreyfuss G (1999) SMN mutants of spinal muscular atrophy patients are defective in binding to snRNP proteins. Proc Natl Acad Sci U S A 96: 11167-72

Pellizzoni L, Kataoka N, Charroux B, Dreyfuss G (1998) A novel function for SMN, the spinal muscular atrophy disease gene product, in pre-mRNA splicing. Cell 95: 615-24

Pellizzoni L, Yong J, Dreyfuss G (2002) Essential Role for the SMN Complex in the Specificity of snRNP Assembly. Science 298: 1775-9

Potter H, Weir L, Leder P (1984) Enhancer-dependent expression of human kappa immunoglobulin genes introduced into mouse pre-B lymphocytes by electroporation. Proc Natl Acad Sci U S A 81: 7161-5

Proudfoot NJ, Furger A, Dye MJ (2002) Integrating mRNA processing with transcription. Cell 108: 501-12

Rajewsky K, Gu H, Kuhn R, Betz UA, Muller W, Roes J, Schwenk F (1996) Conditional gene targeting. J Clin Invest 98: 600-3

Rappsilber J, Ryder U, Lamond AI, Mann M (2002) Large-scale proteomic analysis of the human spliceosome. Genome Res 12: 1231-45

Recillas-Targa F (2004) Gene transfer and expression in mammalian cell lines and transgenic animals. Methods Mol Biol 267: 417-33

Reed R (1989) The organization of 3' splice-site sequences in mammalian introns. Genes Dev 3: 2113-23

Riessland M, Brichta L, Hahnen E, Wirth B (2006) The benzamide M344, a novel histone deacetylase inhibitor, significantly increases SMN2 RNA/protein levels in spinal muscular atrophy (SMA) cells. Medgen: 113 (abstract P293)

Roberts DF, Chavez J, Court SD (1970) The genetic component in child mortality. Arch Dis Child 45: 33-8

Roberts GC, Smith CW (2002) Alternative splicing: combinatorial output from the genome. Curr Opin Chem Biol 6: 375-83

Robertson E, Bradley A, Kuehn M, Evans M (1986) Germ-line transmission of genes introduced into cultured pluripotential cells by retroviral vector. Nature 323: 445-8

Rodriguez CI, Buchholz F, Galloway J, Sequerra R, Kasper J, Ayala R, Stewart AF, Dymecki SM (2000) High-efficiency deleter mice show that FLPe is an alternative to Cre-loxP. Nat Genet 25: 139-40

Rossoll W, Jablonka S, Andreassi C, Kroning AK, Karle K, Monani UR, Sendtner M (2003) Smn, the spinal muscular atrophy-determining gene product, modulates axon growth and localization of beta-actin mRNA in growth cones of motoneurons. J Cell Biol 163: 801-12

Rossoll W, Kroning AK, Ohndorf UM, Steegborn C, Jablonka S, Sendtner M (2002) Specific interaction of Smn, the spinal muscular atrophy determining gene product, with hnRNP-R and gry-rbp/hnRNP-Q: a role for Smn in RNA processing in motor axons? Hum Mol Genet 11: 93-105

Sadowski PD (1995) The Flp recombinase of the 2-microns plasmid of Saccharomyces cerevisiae. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol 51: 53-91

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239: 487-91

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science 230: 1350-4

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci U S A 74: 5463-7

Sauer B, Henderson N (1988) Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. Proc Natl Acad Sci U S A 85: 5166-70

Sauer B, Henderson N (1989) Cre-stimulated recombination at loxP-containing DNA sequences placed into the mammalian genome. Nucleic Acids Res 17: 147-61

Sauer B, Henderson N (1990) Targeted insertion of exogenous DNA into the eukaryotic genome by the Cre recombinase. New Biol 2: 441-9

Schaft J, Ashery-Padan R, van der Hoeven F, Gruss P, Stewart AF (2001) Efficient FLP recombination in mouse ES cells and oocytes. Genesis 31: 6-10

Schrank B, Gotz R, Gunnersen JM, Ure JM, Toyka KV, Smith AG, Sendtner M (1997) Inactivation of the survival motor neuron gene, a candidate gene for human spinal muscular atrophy, leads to massive cell death in early mouse embryos. Proc Natl Acad Sci U S A 94: 9920-5

Schwartzberg PL, Goff SP, Robertson EJ (1989) Germ-line transmission of a c-abl mutation produced by targeted gene disruption in ES cells. Science 246: 799-803

Schwenk F, Baron U, Rajewsky K (1995) A cre-transgenic mouse strain for the ubiquitous deletion of loxP-flanked gene segments including deletion in germ cells. Nucleic Acids Res 23: 5080-1

Segade F, Claudio E, Wrobel K, Ramos S, Lazo PS (1995) Isolation of nine gene sequences induced by silica in murine macrophages. J Immunol 154: 2384-92

Segade F, Hurle B, Claudio E, Ramos S, Lazo PS (1996) Molecular cloning of a mouse homologue for the Drosophila splicing regulator Tra2. FEBS Lett 387: 152-6

Senapathy P, Shapiro MB, Harris NL (1990) Splice junctions, branch point sites, and exons: sequence statistics, identification, and applications to genome project. Methods Enzymol 183: 252-78

Sharma A, Lambrechts A, Hao le T, Le TT, Sewry CA, Ampe C, Burghes AH, Morris GE (2005) A role for complexes of survival of motor neurons (SMN) protein with gemins and profilin in neurite-like cytoplasmic extensions of cultured nerve cells. Exp Cell Res 309: 185-97

Sharp PA (1988) RNA splicing and genes. Jama 260: 3035-41

Shinar D, Yoffe O, Shani M, Yaffe D (1989) Regulated expression of muscle-specific genes introduced into mouse embryonal stem cells: inverse correlation with DNA methylation. Differentiation 41: 116-26

Shiroishi T (2001) [A large-scale mouse mutagenesis with a chemical mutagen ENU]. Tanpakushitsu Kakusan Koso 46: 2613-8

Smith AG (1992) Mouse embryo stem cells: their identification, propagation and manipulation. Semin Cell Biol 3: 385-99

Smith AG, Heath JK, Donaldson DD, Wong GG, Moreau J, Stahl M, Rogers D (1988) Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. Nature 336: 688-90

Smith CW, Porro EB, Patton JG, Nadal-Ginard B (1989) Scanning from an independently specified branch point defines the 3' splice site of mammalian introns. Nature 342: 243-7

Smith CW, Valcarcel J (2000) Alternative pre-mRNA splicing: the logic of combinatorial control. Trends Biochem Sci 25: 381-8

Soriano P (1999) Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. Nat Genet 21: 70-1

Southern EM (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J Mol Biol 98: 503-17

Spector DL (1993) Macromolecular domains within the cell nucleus. Annu Rev Cell Biol 9: 265-315

Srivastava AK, Mohan S, Wergedal JE, Baylink DJ (2003) A genomewide screening of N-ethyl-N-nitrosourea-mutagenized mice for musculoskeletal phenotypes. Bone 33: 179-91

Stamm S, Casper D, Hanson V, Helfman DM (1999) Regulation of the neuron-specific exon of clathrin light chain B. Brain Res Mol Brain Res 64: 108-18

Stephens RM, Schneider TD (1992) Features of spliceosome evolution and function inferred from an analysis of the information at human splice sites. J Mol Biol 228: 1124-36

Sternberg N (1981) Bacteriophage P1 site-specific recombination. III. Strand exchange during recombination at lox sites. J Mol Biol 150: 603-8

Sternberg N, Hamilton D (1981) Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites. J Mol Biol 150: 467-86

Sternberg N, Hamilton D, Austin S, Yarmolinsky M, Hoess R (1981a) Site-specific recombination and its role in the life cycle of bacteriophage P1. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 45 Pt 1: 297-309

Sternberg N, Hamilton D, Hoess R (1981b) Bacteriophage P1 site-specific recombination. II. Recombination between loxP and the bacterial chromosome. J Mol Biol 150: 487-507

Stevens G, Yawitch T, Rodda J, Verhaart S, Krause A (1999) Different molecular basis for spinal muscular atrophy in South African black patients. Am J Med Genet 86: 420-6

Stewart CL (1993) Production of chimeras between embryonic stem cells and embryos. Methods Enzymol 225: 823-55

Stoilov P, Daoud R, Nayler O, Stamm S (2004) Human tra2-beta1 autoregulates its protein concentration by influencing alternative splicing of its pre-mRNA. Hum Mol Genet 13: 509-24

Sumner CJ, Huynh TN, Markowitz JA, Perhac JS, Hill B, Coovert DD, Schussler K, Chen X, Jarecki J, Burghes AH, Taylor JP, Fischbeck KH (2003) Valproic acid increases SMN levels in spinal muscular atrophy patient cells. Ann Neurol 54: 647-54

Tacke R, Manley JL (1999) Determinants of SR protein specificity. Curr Opin Cell Biol 11: 358-62

Tacke R, Tohyama M, Ogawa S, Manley JL (1998) Human Tra2 proteins are sequence-specific activators of pre-mRNA splicing. Cell 93: 139-48

Tarn WY, Steitz JA (1994) SR proteins can compensate for the loss of U1 snRNP functions in vitro. Genes Dev 8: 2704-17

Taylor JE, Thomas NH, Lewis CM, Abbs SJ, Rodrigues NR, Davies KE, Mathew CG (1998) Correlation of SMNt and SMNc gene copy number with age of onset and survival in spinal muscular atrophy. Eur J Hum Genet 6: 467-74

Terns MP, Terns RM (2001) Macromolecular complexes: SMN--the master assembler. Curr Biol 11: R862-4

Tian M, Maniatis T (1993) A splicing enhancer complex controls alternative splicing of doublesex pre-mRNA. Cell 74: 105-14

Torres R., R. K (1997) Laboratory Protocols for Conditional Gene Targeting. Oxford University Press

Tsai LK, Tsai MS, Ting CH, Li H (2008) Multiple therapeutic effects of valproic acid in spinal muscular atrophy model mice. J Mol Med

Tsukamoto Y, Matsuo N, Ozawa K, Hori O, Higashi T, Nishizaki J, Tohnai N, Nagata I, Kawano K, Yutani C, Hirota S, Kitamura Y, Stern DM, Ogawa S (2001) Expression of a novel RNA-splicing factor, RA301/Tra2beta, in vascular lesions and its role in smooth muscle cell proliferation. Am J Pathol 158: 1685-94

Umen JG, Guthrie C (1995a) A novel role for a U5 snRNP protein in 3' splice site selection. Genes Dev 9: 855-68

Umen JG, Guthrie C (1995b) Prp16p, Slu7p, and Prp8p interact with the 3' splice site in two distinct stages during the second catalytic step of pre-mRNA splicing. Rna 1: 584-97

Ure JM, Fiering S, Smith AG (1992) A rapid and efficient method for freezing and recovering clones of embryonic stem cells. Trends Genet 8: 6

Utomo AR, Nikitin AY, Lee WH (1999) Temporal, spatial, and cell type-specific control of Cre-mediated DNA recombination in transgenic mice. Nat Biotechnol 17: 1091-6

Venables JP, Bourgeois CF, Dalgliesh C, Kister L, Stevenin J, Elliott DJ (2005) Up-regulation of the ubiquitous alternative splicing factor Tra2beta causes inclusion of a germ cell-specific exon. Hum Mol Genet 14: 2289-303

Venables JP, Elliott DJ, Makarova OV, Makarov EM, Cooke HJ, Eperon IC (2000) RBMY, a probable human spermatogenesis factor, and other hnRNP G proteins interact with Tra2beta and affect splicing. Hum Mol Genet 9: 685-94

Viollet L, Bertrandy S, Bueno Brunialti AL, Lefebvre S, Burlet P, Clermont O, Cruaud C, Guenet JL, Munnich A, Melki J (1997) cDNA isolation, expression, and chromosomal localization of the mouse survival motor neuron gene (Smn). Genomics 40: 185-8

Vitte JM, Davoult B, Roblot N, Mayer M, Joshi V, Courageot S, Tronche F, Vadrot J, Moreau MH, Kemeny F, Melki J (2004) Deletion of murine Smn exon 7 directed to liver leads to severe defect of liver development associated with iron overload. Am J Pathol 165: 1731-41

Vogelstein B, Gillespie D (1979) Preparative and analytical purification of DNA from agarose. Proc Natl Acad Sci U S A 76: 615-9

Wahl GM, Berger SL, Kimmel AR (1987) Molecular hybridization of immobilized nucleic acids: theoretical concepts and practical considerations. Methods Enzymol 152: 399-407

Wang CH, Xu J, Carter TA, Ross BM, Dominski MK, Bellcross CA, Penchaszadeh GK, Munsat TL, Gilliam TC (1996) Characterization of survival motor neuron (SMNT) gene deletions in asymptomatic carriers of spinal muscular atrophy. Hum Mol Genet 5: 359-65

Wang GS, Cooper TA (2007) Splicing in disease: disruption of the splicing code and the decoding machinery. Nat Rev Genet 8: 749-61

Wang J, Xiao SH, Manley JL (1998) Genetic analysis of the SR protein ASF/SF2: interchangeability of RS domains and negative control of splicing. Genes Dev 12: 2222-33

Watermann DO, Tang Y, Zur Hausen A, Jager M, Stamm S, Stickeler E (2006) Splicing factor Tra2-beta1 is specifically induced in breast cancer and regulates alternative splicing of the CD44 gene. Cancer Res 66: 4774-80

Waterston RH, Lindblad-Toh K, Birney E, Rogers J, Abril JF, Agarwal P, Agarwala R, Ainscough R, Alexandersson M, An P, Antonarakis SE, Attwood J, Baertsch R, Bailey J, Barlow K, Beck S, Berry E, Birren B, Bloom T, Bork P, Botcherby M, Bray N, Brent MR, Brown DG, Brown SD, Bult C, Burton J, Butler J, Campbell RD, Carninci P, Cawley S, Chiaromonte F, Chinwalla AT, Church DM, Clamp M, Clee C, Collins FS, Cook LL, Copley RR, Coulson A, Couronne O, Cuff J, Curwen V, Cutts T, Daly M, David R, Davies J, Delehaunty KD, Deri J, Dermitzakis ET, Dewey C, Dickens NJ, Diekhans M, Dodge S, Dubchak I, Dunn DM, Eddy SR, Elnitski L, Emes RD, Eswara P, Eyras E, Felsenfeld A, Fewell GA, Flicek P, Foley K, Frankel WN, Fulton LA, Fulton RS, Furey TS, Gage D, Gibbs RA, Glusman G, Gnerre S, Goldman N, Goodstadt L, Grafham D, Graves TA, Green ED, Gregory S, Guigo R, Guyer M, Hardison RC, Haussler D, Hayashizaki Y, Hillier LW, Hinrichs A, Hlavina W, Holzer T, Hsu F, Hua A, Hubbard T, Hunt A, Jackson I, Jaffe DB, Johnson LS, Jones M, Jones TA, Joy A, Kamal M, Karlsson EK, et al. (2002) Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. Nature 420: 520-62

Weighardt F, Biamonti G, Riva S (1996) The roles of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins (hnRNP) in RNA metabolism. Bioessays 18: 747-56

Wetmur JG (1991) DNA probes: applications of the principles of nucleic acid hybridization. Crit Rev Biochem Mol Biol 26: 227-59

Williams RL, Hilton DJ, Pease S, Willson TA, Stewart CL, Gearing DP, Wagner EF, Metcalf D, Nicola NA, Gough NM (1988) Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. Nature 336: 684-7

Williamson DJ, Banik-Maiti S, DeGregori J, Ruley HE (2000) hnRNP C is required for post-implantation mouse development but Is dispensable for cell viability. Mol Cell Biol 20: 4094-105

Wirth B (2000) An update of the mutation spectrum of the survival motor neuron gene (SMN1) in autosomal recessive spinal muscular atrophy (SMA). Hum Mutat 15: 228-37

Wirth B (2002) Spinal muscular atrophy: state-of-the-art and therapeutic perspectives. Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord 3: 87-95

Wirth B, Brichta L, Hahnen E (2006a) Spinal muscular atrophy and therapeutic prospects. Prog Mol Subcell Biol 44: 109-32

Wirth B, Brichta L, Hahnen E (2006b) Spinal muscular atrophy: from gene to therapy. Semin Pediatr Neurol 13: 121-31

Wolpert L (1998) Entwicklungsbiologie

Yean SL, Lin RJ (1991) U4 small nuclear RNA dissociates from a yeast spliceosome and does not participate in the subsequent splicing reaction. Mol Cell Biol 11: 5571-7

Yeo G, Holste D, Kreiman G, Burge CB (2004) Variation in alternative splicing across human tissues. Genome Biol 5: R74

Young PJ, Day PM, Zhou J, Androphy EJ, Morris GE, Lorson CL (2002a) A direct interaction between the survival motor neuron protein and p53 and its relationship to spinal muscular atrophy. J Biol Chem 277: 2852-9

Young PJ, DiDonato CJ, Hu D, Kothary R, Androphy EJ, Lorson CL (2002b) SRp30c-dependent stimulation of survival motor neuron (SMN) exon 7 inclusion is facilitated by a direct interaction with hTra2 beta 1. Hum Mol Genet 11: 577-87

Young PJ, Le TT, thi Man N, Burghes AH, Morris GE (2000) The relationship between SMN, the spinal muscular atrophy protein, and nuclear coiled bodies in differentiated tissues and cultured cells. Exp Cell Res 256: 365-74

Zahler AM (1999) Purification of SR protein splicing factors. Methods Mol Biol 118: 419-32

Zamore PD, Patton JG, Green MR (1992) Cloning and domain structure of the mammalian splicing factor U2AF. Nature 355: 609-14

Zerres K, Rudnik-Schoneborn S (1995) Natural history in proximal spinal muscular atrophy. Clinical analysis of 445 patients and suggestions for a modification of existing classifications. Arch Neurol 52: 518-23

Zhang H, Xing L, Rossoll W, Wichterle H, Singer RH, Bassell GJ (2006) Multiprotein complexes of the survival of motor neuron protein SMN with Gemins traffic to neuronal processes and growth cones of motor neurons. J Neurosci 26: 8622-32

Zhang HL, Pan F, Hong D, Shenoy SM, Singer RH, Bassell GJ (2003) Active transport of the survival motor neuron protein and the role of exon-7 in cytoplasmic localization. J Neurosci 23: 6627-37

Zijlstra M, Li E, Sajjadi F, Subramani S, Jaenisch R (1989) Germ-line transmission of a disrupted beta 2-microglobulin gene produced by homologous recombination in embryonic stem cells. Nature 342: 435-8

Zorio DA, Blumenthal T (1999) Both subunits of U2AF recognize the 3' splice site in Caenorhabditis elegans. Nature 402: 835-8

8. Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

Es gelten die SI-Einheiten und die daraus ableitbaren zusammengesetzten Größen.

°C	Grad Celsius
5’	DNA 5’-Terminus
3’	DNA 3’-Terminus
α-	anti-
α^{32}P dCTP	Desoxycytosin-5’-[α^{32}P]-triphosphat
A	Adenin
Abb.	Abbildung
ad	auf
Ag	Agarose
Aqua dest.	demineralisiertes Wasser
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BL6	C57Black/6
BSA	*bovine serum albumin*
bzw.	beziehungsweise
ca	cirka
c	Zenti-
C	Cytosin
cDNA	*complementary* DNA
CO_2	Kohlenstoffdioxid
Cre-(Rekombinase)	*cyclization recombination*
C-terminus	Carboxy-Terminus
die	die (lat. Tag)
DAB	3,3’-Diaminobenzidin
dATP	Desoxyadenin-5’-triphosphat
dCTP	Desoxycytidin-5’-triphosphat
dH_2O	entsalztes Wasser
ddH_2O	vollentsalztes Wasser
dGTP	Desoxyguanin-5’-triphosphat
dTTP	Desoxythymidin-5’-triphosphat
d.h.	das heißt
DH5α	*E. coli* Stamm
DMSO	Dimethylsulfoxid
D-mem	*Dulbecco’s modified eagle medium*
DNA	*deoxyribonucleic acid*
D-PBS	*Dulbecco’s phosphate buffered saline*
dpc	*days post coitum*
DTT	Dithiothreitol
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
ddNTP	Didesoxynukleotidtriphosphat
ds	*double strand*
E	Embryonalstadium
E. coli	*Escherichia coli*
EDTA	Ethylendiamin-Tetraacetat
ES-Zellen	embryonale Stammzellen
et al.	et alii (lat.und andere)
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
Ex	Exon
ESE	*exonix splicing enhancer*
ESS	*exonic splicing silencer*
fw	*forward*
FKS	fetales Kälberserum
FL	gefloxt (*floxed)*
FL	*full-length (transcript)*
flox	*loxP flanked*
Flp	*Flp-recombinase*
FRT	*Flp-recombinase target*
g	Gramm; 9,81 m/s^2
G	Guanin
G418	Geniticin
Ganc	Ganciclovir
GVO	Genetisch veränderte Organismen
h	hora (lat. Stunde)
HCl	Salzsäure
hCMV	*human cytomegalo virus*
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)- ethansulfonsäure
het.	heterozygot

hom.	homozygot
hnRNA	*heterogenous nuclear RNA*
hnRNP	*heterogenous nuclear ribonucleo protein*
HTN-Cre	His-TAT-NLS-Cre (His-getaggte Cre mit nucleärem Lokalisationssignal)
I	Intron
ISE	*intronic splicing enhancer*
ISS	*intronic splicing silencer*
IRES	*initiating ribosome entrance site*
k	Kilo-
kb(p)	Kilobasen(paare)
kDa	Kilo Dalton
Kontr.	Kontrolle
l	Liter
LB-Agar	*Luria Bertani* Agar
LB-Medium	*Luria Bertani* Medium
LC	Light Cycler
LIF	*leucemia inhibitory factor*
loxP	*locus of x-ing over of phage P1*
m	Milli-
M	Mol
ME	β-Mercaptoethanol
mA	Milliampere
Mg	Milligramm
$MgSO_4$	Magnesiumsulfat
MGI	*Mouse genome informatics*
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MMC	Mitomycin C
mRNA	*messenger ribonucleic acid*
µ	Mikro-
µCi	Mikrocurie
µF	Mikrofarad
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
N	Nano-
neg	negativ
NaAc	Natriumacetat

NCBI	*National Center for Biotechnology Information*
Na-Citrat	Natriumcitrat
NaCl	Natriumchlorid
NEAs	nicht-essentielle Aminosäuren
NaOH	Natronlauge
NaH_2PO_4	Natriumdihydrogenphosphat
Neo	Neomycin
ng	Nanogramm
NFL	*neurofilament-like gene*
N-Terminus	Amino-Terminus
OD	optische Dichte
OH-Gruppe	Hydroxyl-Gruppe
ORF	*open reading frame*
p	Pico-
P	*Post natal*
P1	Bakteriophage P1
PAA	Polyacrylamid
PBS	*phosphate buffered saline*
PCR	*polymerase chain reaction*
PenStrep	Penicillin/Streptomycin
Pg	Pikogramm
pH	*pondus Hydrogenii*
pos	positiv
pRF	Plasmid Rapidflirt (der *targeting*-Vektor)
Prot K	Proteinase K
Prom.	Promotor
p-Wert	Signifikanz/Überschreitungswahrscheinlichkeit
rk	rekombinant
rev	*reverse*
RNA	*ribonucleic acid*
RNase A	Ribonuclease A
rpm	*rounds per minute*
RT	Raum-Temperatur bzw. reverse Transkription
SDS	Natriumdodecylsulfat
SE	*splicing enhancer*
sek	Sekunde
seq	Sequenz/Sequenzierung
SEM	*standard error of the mean*
Sfrs10	*splicing factor arginin serin-rich 10*

SMA	*spinal muscular atrophy*
SMN	*survival motor neuron gene*
S.O.C.	SOB-Medium mit Glucose
ss	*single strand*
SS	*splice site*
SSC	Trinatriumcitrat
ss-DNA	*salm sperm DNA*
T	Thymidin
T4	Bakteriophage T4
TBE-Puffer	Tris-Borsäure-EDTA-Puffer
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
TE^{-4}-Puffer	Tris-$(EDTA)^{-4}$-Puffer
tg	transgen
TK	Thymidinkinase
TOP10	*E. coli*-Stamm
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
T_M	Schmelzpunkt

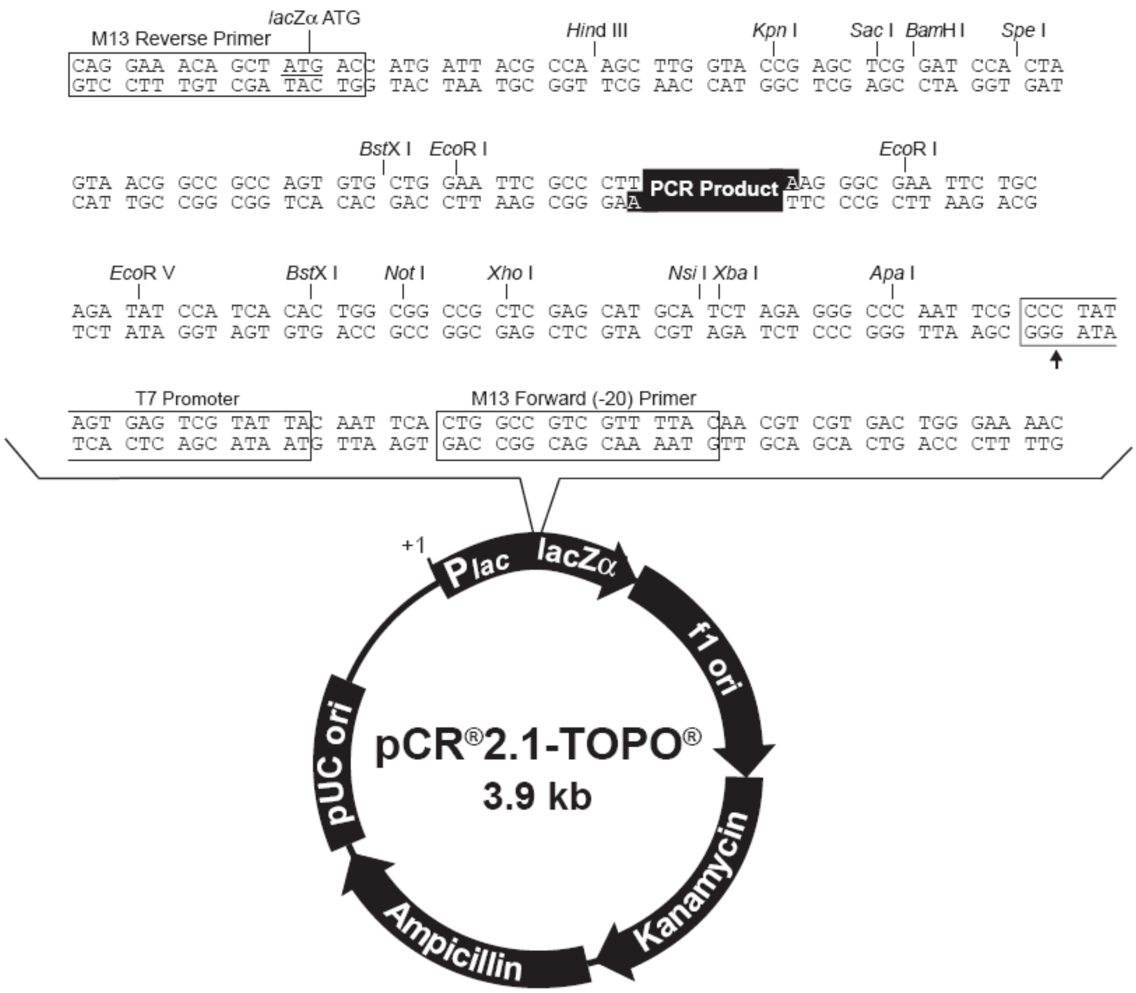
U	Unit (Enzymeinheit)
u.a.	unter anderem bzw. und andere
ü.N.	über Nacht
UTR	*untranslated region*
UV	Ultraviolett
V	Variante
V	Volt
VL	Volllänge (Transkript)
Vol.	Volumen
v/v	Volumenprozent
vgl.	vergleiche
W	Watt
wt	Wildtyp/wildtypisch
w/v	Gewichtsprozent
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem
z.T.	zum Teil

Bei einigen Begriffen, wie z.B. *Blot*, wurden die englischen Fachtermini verwendet, da auch in der deutschsprachigen Literatur eine Übersetzung unüblich ist. Diese sind kursiv geschrieben. Bezeichnungen für Gene oder Transkripte wurden kursiv und solche für Proteine nicht kursiv geschrieben. Humane Gen-, Transkript- oder Proteinvarianten wurden mit Großbuchstaben beschrieben, während murine Ortholge nur mit großen Anfangsbuchstaben bezeichnet wurden.

8.2 Vektorkarten

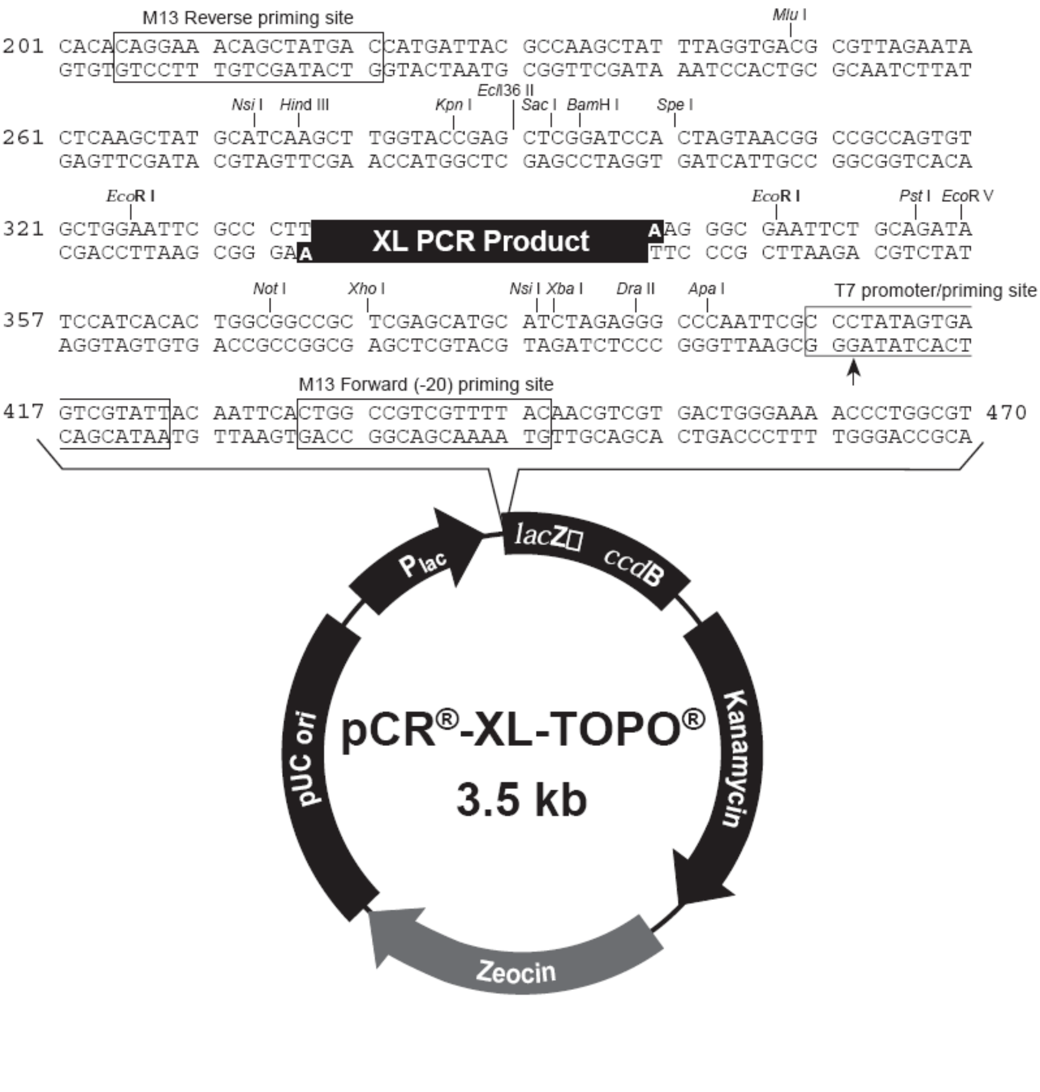
8.2.1 Vektor pCR®2.1-TOPO

Die Abbildung ist dem Benutzerhandbuch des Herstellers Invitrogen entnommen.



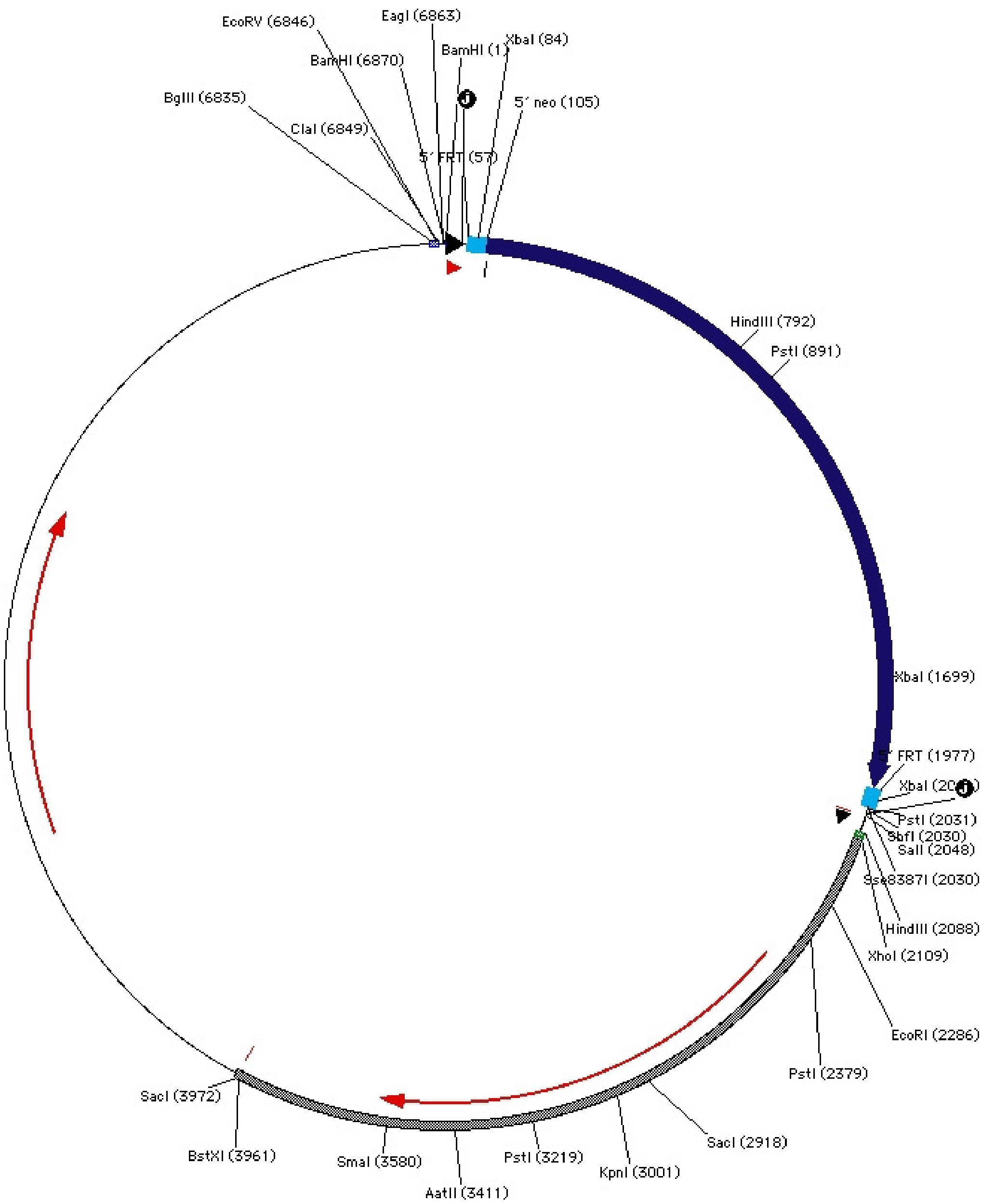
8.2.2 Vektor pCR®-XL-TOPO

Die Abbildung ist dem Benutzerhandbuch des Herstellers Invitrogen entnommen.



8.2.3 Vektor pRapidflirt

Prapidflirt wurde von Ari Waisman und Anja Brühl generiert (unveröffentlicht). Der Vektor und die Abbildung wurden mit ihrer freundlichen Unterstützung zur Verfügung gestellt.



8.3 Sequenz des pRapidflirts

Gekennzeichnet sind: loxP-Stellen (orange), FRT-Stellen (dunkelblau), *Neomycin*-Kassette (grau), *Thymidinkinase*-Gen (grün) und das *Ampicillinresistenz*-Gen (rot). Wichtige Primer sind mit Pfeilen und deren interner Nummer markiert. Zur Klonierung, Restriktion für *Southern*-Analysen oder Linearisierung des Vektors verwendete Restriktionsschnittstellen sind vermerkt. Die Sonde zur Detektion der *Neomycin*-Kassette in *Southern*-Analysen ist unterstrichen.

```
        BamH I  5'loxP          -------------3078-------------→ 2528 ---------------------------------→
   1   GGATCCATAA CTTCGTATAA TGTATGCTAT ACGAAGTTAT GAATTGGCCG
              5'FRT
  51   CTCGACGAAG TTCCTATTCC GAAGTTCCTA TTCTCTAGAA AGTATAGGAA
 101   CTTCTACCGG GTAGGGGAGG CGCTTTTCCC AAGGCAGTCT GGAGCATGCG   Neomycin-Kassette
 151   CTTTAGCAGC CCCGCTGGCA CTTGGCGCTA CACAAGTGGC CTCTGGCCTC
 201   GCACACATTC CACATCCACC GGTAGCGCCA ACCGGCTCCG TTCTTTGGTG
 251   GCCCCTTCGC GCCACTTCTA CTCCTCCCCT AGTCAGGAAG TTTCCCCCCC
                   ---------------2508---------------→
 301   GCCCCGCAGC TCGCGTCGTG CAGGACGTGA CAAATGGAAG TAGCACGTCT
 351   CACTAGTCTC GTGCAGATGG ACAGCACCGC TGAGCAATGG AAGCGGGTAG
 401   GCCTTTGGGG CAGCGGCCAA TAGCAGCTTT GCTCCTTCGC TTTCTGGGCT
 451   CAGAGGCTGG GAAGGGGTGG GTCCGGGGGC GGGCTCAGGG GCGGGCTCAG
 501   GGGCGGGGCG GGCGCCCGAA GGTCCTCCGG AGGCCCGGCA TTCTGCACGC
 551   TTCAAAAGCG CACGTCTGCC GCGCTGTTCT CCTCTTCCTC ATCTCCGGGC
 601   CTTTCGACCA ATTCGCTGTC TGCGAGGGCC AGCTGTTGGG GTGAGTACTC
 651   CCTCTCAAAA GCGGGCATGA CTTCTGCGCT AAGATTGTCA GTTTCCAAAA
                 ------------------2509------------------→
 701   ACGAGGAGGA TTTGATATTC ACCTGGCCCG CGGTGATGCC TTTGAGGGTG
 751   GCCGCGTCCA TCTGGTCAGA AAAGACAATC TTTTTGTTGT CAAGCTTGAG
 801   GTGTGGCAGG CTTGAGATCT GGCCATACAC TTGAGTGACA ATGACATCCA
                                                      Pst I
 851   CTTTGCCTTT CTCTCCACAG GTGTCCACTC CCAGGTCCAA CTGCAGCCAC
 901   CATGATTGAA CAAGATGGAT TGCACGCAGG TTCTCCGGCC GCTTGGGTGG
 951   AGAGGCTATT CGGCTATGAC TGGGCACAAC AGACAATCGG CTGCTCTGAT
1001   GCCGCCGTGT TCCGGCTGTC AGCGCAGGGG CGCCCGGTTC TTTTTGTCAA
                             ---------------3220---------------→
1051   GACCGACCTG TCCGGTGCCC TGAATGAACT GCAAGACGAG GCAGCGCGGC   Neo-Sonde
                                                 ------------------
1101   TATCGTGGCT GGCCACGACG GGCGTTCCTT GCGCAGCTGT GCTCGACGTT
       -----2529-----→
1151   GTCACTGAAG CGGGAAGGGA CTGGCTGCTA TTGGGCGAAG TGCCGGGGCA
```

1201 GGATCTCCTG TCATCTCACC TTGCTCCTGC CGAGAAAGTA TCCATCATGG

1251 CTGATGCAAT GCGGCGGCTG CATACGCTTG ATCCGGCTAC CTGCCCATTC

1301 GACCACCAAG CGAAACATCG CATCGAGCGA GCACGTACTC GGATGGAAGC

1351 CGGTCTTGTC GATCAGGATG ATCTGGACGA AGAGCATCAG GGGCTCGCGC

1401 CAGCCGAACT GTTCGCCAGG CTCAAGGCGA GCATGCCCGA CGGCGAGGAT

1451 CTCGTCGTGA CCCATGGCGA TGCCTGCTTG CCGAATATCA TGGTGGAAAA

2511 →

1501 TGGCCGCTTT TCTGGATTCA TCGACTGTGG CCGGCTGGGT GTGGCGGACC

← 3221

1551 GCTATCAGGA CATAGCGTTG GCTACCCGTG ATATTGCTGA AGAGCTTGGC

1601 GGCGAATGGG CTGACCGCTT CCTCGTGCTT TACGGTATCG CCGCTCCCGA

1651 TTCGCAGCGC ATCGCCTTCT ATCGCCTTCT TGACGAGTTC TTCTGAGCTC

Sac I

1701 TAGAGCTCGC TGATCAGCCT CGACTGTGCC TTCTAGTTGC CAGCCATCTG

1751 TTGTTTGCCC CTCCCCCGTG CCTTCCTTGA CCCTGGAAGG TGCCACTCCC

1801 ACTGTCCTTT CCTAATAAAA TGAGGAAATT GCATCGCATT GTCTGAGTAG

1851 GTGTCATTCT ATTCTGGGGG GTGGGGTGGG GCAGGACAGC AAGGGGGAGG

1901 ATTGGGAAGA CAATAGCAGG CATGCTGGGG ATGCGGTGGG CTCTATGGCT

2158 → 3'FRT

1951 TCTGAGGCGG AAAGAACCAG CTGGGGGAAG TTCCTATTCC GAAGTTCCTA

Pst I Sal I

2001 TTCTCTAGAA AGTATAGGAA CTTCCTCGAC CTGCAGGCGG CCCTAGAGTC

3'loxP ← 3101 2160 →

2051 GACATAACTT CGTATAATGT ATGCTATACG AAGTTATAAG CTTGCGGCCG

Xho I

2101 GCCGCCACCT CGAGCAGTGT GGTTTTGCAA GAGGAAGCAA AAAGCCTCTC

2151 CACCCAGGCC TGGAATGTTT CCACCCAATG TCGAGCAGTG TGGTTTTGCA

2201 AGAGGAAGCA AAAAGCCTCT CCACCCAGGC CTGGAATGTT TCCACCCAAT

2251 GTCGAGCAAA CCCCGCCCAG CGTCTTGTCA TTGGCGAATT CGAACACGCA

2301 GATGCAGTCG GGGCGGCGCG GTCCGAGGTC CACTTCGCAT ATTAAGGTGA

2351 CGCGTGTGGC CTCGAACACC GAGCGACCCT GCAGCGACCC GCTTAACAGC

2516 →

2401 GTCAACAGCG TGCCGCAGAT CTTGGTGGCG TGAAACTCCC GCACCTCTTC

2451 GGCCAGCGCC TTGTAGAAGC GCGTATGGCT TCGTACCCCG GCCATCAACA *Thymidinkinase-Gen*

2501 CGCGTCTGCG TTCGACCAGG CTGCGCGTTC TCGCGGCCAT AGCAACCGAC

2551 GTACGGCGTT GCGCCCTCGC CGGCAGCAAG AAGCCACGGA AGTCCGCCCG

2601 GAGCAGAAAA TGCCCACGCT ACTGCGGGTT TATATAGACG GTCCCCACGG

2651 GATGGGGAAA ACCACCACCA CGCAACTGCT GGTGGCCCTG GGTTCGCGCG

2701 ACGATATCGT CTACGTACCC GAGCCGATGA CTTACTGGCG GGTGCTGGGG

```
2751   GCTTCCGAGA CAATCGCGAA CATCTACACC ACACAACACC GCCTCGACCA
                      2517
          ------------------------------------→
2801   GGGTGAGATA TCGGCCGGGG ACGCGGCGGT GGTAATGACA AGCGCCCAGA

2851   TAACAATGGG CATGCCTTAT GCCGTGACCG ACGCCGTTCT GGCTCCTCAT

2901   ATCGGGGGGG AGGCTGGGAG CTCACATGCC CCGCCCCCGG CCCTCACCCT

2951   CATCTTCGAC CGCCATCCCA TCGCCGCCCT CCTGTGCTAC CCGGCCGCGC

3001   GGTACCTTAT GGGCAGCATG ACCCCCCAGG CCGTGCTGGC GTTCGTGGCC

3051   CTCATCCCGC CGACCTTGCC CGGCACCAAC ATCGTGCTTG GGGCCCTTCC

3101   GGAGGACAGA CACATCGACC GCCTGGCCAA ACGCCAGCGC CCCGGCGAGC

3151   GGCTGGACCT GGCTATGCTG GCTGCGATTC GCCGCGTTTA CGGGCTACTT
                                                        ------
3201   GCCAATACGG TGCGGTATCT GCAGTGCGGC GGGTCGTGGC GGGAGGACTG
                   2518
       ------------------------------→
3251   GGGACAGCTT TCGGGGACGG CCGTGCCGCC CCAGGGTGCC GAGCCCCAGA

3301   GCAACGCGGG CCCACGACCC CATATCGGGG ACACGTTATT TACCCTGTTT

3351   CGGGCCCCCG AGTTGCTGGC CCCCAACGGC GACCTGTATA ACGTGTTTGC

3401   CTGGGCCTTG GACGTCTTGG CCAAACGCCT CCGTTCCATG CACGTCTTTA

3451   TCCTGGATTA CGACCAATCG CCCGCCGGCT GCCGGGACGC CCTGCTGCAA

3501   CTTACCTCCG GGATGGTCCA GACCCACGTC ACCACCCCCG GCTCCATACC

3551   GACGATATGC GACCTGGCGC GCACGTTTGC CCGGGAGATG GGGGAGGCTA

3601   ACTGAAACAC GGAAGGAGAC AATACCGGAA GGAACCCGCG CTATGACGGC
                                2519
               ←------------------------------------
3651   AATAAAAAGA CAGAATAAAA CGCACGGGTG TTGGGTCGTT TGTTCATAAA

3701   CGCGGGGTTC GGTCCCAGGG CTGGCACTCT GTCGATACCC CACCGAGACC

3751   CCATTGGGGC CAATACGCCC GCGTTTCTTC CTTTTCCCCA CCCCACCCCC

3801   CAAGTTCGGG TGAAGGCCCA GGGCTCGCAG CCAACGTCGG GGCGGCAGGC

3851   CCTGCCATAG CCACTGGCCC CGTGGGTTAG GGACGGGGTC CCCCATGGGG

3901   AATGGTTTAT GGTTCGTGGG GGTTATTATT TTGGGCGTTG CGTGGGGTCT

3951   GGTGGACGAC CCAAGCTGGT GGAGCTCCAA TTCGCCCTAT AGTGAGTCGT

4001   ATTACGCGCG CTCACTGGCC GTCGTTTTAC AACGTCGTGA CTGGGAAAAC

4051   CCTGGCGTTA CCCAACTTAA TCGCCTTGCA GCACATCCCC CTTTCGCCAG

4101   CTGGCGTAAT AGCGAAGAGG CCCGCACCGA TCGCCCTTCC CAACAGTTGC

4151   GCAGCCTGAA TGGCGAATGG GACGCGCCCT GTAGCGGCGC ATTAAGCGCG

4201   GCGGGTGTGG TGGTTACGCG CAGCGTGACC GCTACACTTG CCAGCGCCCT

4251   AGCGCCCGCT CCTTTCGCTT TCTTCCCTTC CTTTCTCGCC ACGTTCGCCG

4301   GCTTTCCCCG TCAAGCTCTA AATCGGGGGC TCCCTTTAGG GTTCCGATTT
```

4351 AGTGCTTTAC GGCACCTCGA CCCCAAAAAA CTTGATTAGG GTGATGGTTC

4401 ACGTAGTGGG CCATCGCCCT GATAGACGGT TTTTCGCCCT TTGACGTTGG

4451 AGTCCACGTT CTTTAATAGT GGACTCTTGT TCCAAACTGG AACAACACTC

4501 AACCCTATCT CGGTCTATTC TTTTGATTTA TAAGGGATTT TGCCGATTTC

4551 GGCCTATTGG TTAAAAAATG AGCTGATTTA ACAAAAATTT AACGCGAATT

4601 TTAACAAAAT ATTAACGCTT ACAATTTAGG TGGCACTTTT CGGGGAAATG

4651 TGCGCGGAAC CCCTATTTGT TTATTTTTCT AAATACATTC AAATATGTAT

4701 CCGCTCATGA GACAATAACC CTGATAAATG CTTCAATAAT ATTGAAAAAG

4751 GAAGAGTATG AGTATTCAAC ATTTCCGTGT CGCCCTTATT CCCTTTTTTG *Ampicillinresistenz-*

4801 CGGCATTTTG CCTTCCTGTT TTTGCTCACC CAGAAACGCT GGTGAAAGTA Gen

4851 AAAGATGCTG AAGATCAGTT GGGTGCACGA GTGGGTTACA TCGAACTGGA

4901 TCTCAACAGC GGTAAGATCC TTGAGAGTTT TCGCCCCGAA GAACGTTTTC

4951 CAATGATGAG CACTTTTAAA GTTCTGCTAT GTGGCGCGGT ATTATCCCGT

5001 ATTGACGCCG GGCAAGAGCA ACTCGGTCGC CGCATACACT ATTCTCAGAA

5051 TGACTTGGTT GAGTACTCAC CAGTCACAGA AAAGCATCTT ACGGATGGCA

5101 TGACAGTAAG AGAATTATGC AGTGCTGCCA TAACCATGAG TGATAACACT

5151 GCGGCCAACT TACTTCTGAC AACGATCGGA GGACCGAAGG AGCTAACCGC

5201 TTTTTTGCAC AACATGGGGG ATCATGTAAC TCGCCTTGAT CGTTGGGAAC

5251 CGGAGCTGAA TGAAGCCATA CCAAACGACG AGCGTGACAC CACGATGCCT

5301 GTAGCAATGG CAACAACGTT GCGCAAACTA TTAACTGGCG AACTACTTAC

5351 TCTAGCTTCC CGGCAACAAT TAATAGACTG GATGGAGGCG GATAAAGTTG

5401 CAGGACCACT TCTGCGCTCG GCCCTTCCGG CTGGCTGGTT TATTGCTGAT

5451 AAATCTGGAG CCGGTGAGCG TGGGTCTCGC GGTATCATTG CAGCACTGGG

5501 GCCAGATGGT AAGCCCTCCC GTATCGTAGT TATCTACACG ACGGGGAGTC

5551 AGGCAACTAT GGATGAACGA AATAGACAGA TCGCTGAGAT AGGTGCCTCA

5601 CTGATTAAGC ATTGGTAACT GTCAGACCAA GTTTACTCAT ATATACTTTA

5651 GATTGATTTA AAACTTCATT TTTAATTTAA AAGGATCTAG GTGAAGATCC

5701 TTTTTGATAA TCTCATGACC AAAATCCCTT AACGTGAGTT TTCGTTCCAC

5751 TGAGCGTCAG ACCCCGTAGA AAAGATCAAA GGATCTTCTT GAGATCCTTT

5801 TTTTCTGCGC GTAATCTGCT GCTTGCAAAC AAAAAAACCA CCGCTACCAG

5851 CGGTGGTTTG TTTGCCGGAT CAAGAGCTAC CAACTCTTTT TCCGAAGGTA

```
5901  ACTGGCTTCA GCAGAGCGCA GATACCAAAT ACTGTCCTTC TAGTGTAGCC
5951  GTAGTTAGGC CACCACTTCA AGAACTCTGT AGCACCGCCT ACATACCTCG
6001  CTCTGCTAAT CCTGTTACCA GTGGCTGCTG CCAGTGGCGA TAAGTCGTGT
6051  CTTACCGGGT TGGACTCAAG ACGATAGTTA CCGGATAAGG CGCAGCGGTC
6101  GGGCTGAACG GGGGGTTCGT GCACACAGCC CAGCTTGGAG CGAACGACCT
6151  ACACCGAACT GAGATACCTA CAGCGTGAGC TATGAGAAAG CGCCACGCTT
6201  CCCGAAGGGA GAAAGGCGGA CAGGTATCCG GTAAGCGGCA GGGTCGGAAC
6251  AGGAGAGCGC ACGAGGGAGC TTCCAGGGGG AAACGCCTGG TATCTTTATA
6301  GTCCTGTCGG GTTTCGCCAC CTCTGACTTG AGCGTCGATT TTTGTGATGC
6351  TCGTCAGGGG GGCGGAGCCT ATGGAAAAAC GCCAGCAACG CGGCCTTTTT
6401  ACGGTTCCTG GCCTTTTGCT GGCCTTTTGC TCACATGTTC TTTCCTGCGT
6451  TATCCCCTGA TTCTGTGGAT AACCGTATTA CCGCCTTTGA GTGAGCTGAT
6501  ACCGCTCGCC GCAGCCGAAC GACCGAGCGC AGCGAGTCAG TGAGCGAGGA
6551  AGCGGAAGAG CGCCCAATAC GCAAACCGCC TCTCCCCGCG CGTTGGCCGA
6601  TTCATTAATG CAGCTGGCAC GACAGGTTTC CCGACTGGAA AGCGGGCAGT
6651  GAGCGCAACG CAATTAATGT GAGTTAGCTC ACTCATTAGG CACCCCAGGC
6701  TTTACACTTT ATGCTTCCGG CTCGTATGTT GTGTGGAATT GTGAGCGGAT
6751  AACAATTTCA CACAGGAAAC AGCTATGACC ATGATTACGC CAAGCGCGCA
6801  ATTAACCCTC ACTAAAGGGA ACAAAAGCTG GTCGAGATCT AGCTAGATAT
                   Not I
6851  CGATGGCCAT AGCGGCCGC
```

8.4 Genomische Sequenz des murinen *Sfrs10*

Gekennzeichnet sind: Exons (graue Markierung), die 5'-Box (grün), die KO-Region (orange) und die 3'-Box (blau). Wichtige Primer sind mit Pfeilen und deren interner Nummer markiert. Falls Primer mit Restriktionsschnittstellen modifiziert wurden ist dies vermerkt. Wichtige Restriktionsschnittstellen in der Sequenz sind markiert. Die Sequenz der in *Southern Blot*-Analysen verwendeten Sonden ist unterstrichen. Die Angaben liegen der genomischen Sfrs10-Sequenz (NC_000082) zugrunde

```
   1 aggggccagg aaagcgcgcc ttcgggggag tgggtgggac caggttaaag
  51 agcgtggcgt cacatccggc agtgttagac cggtgcggag gtggtgcgga
 101 GCGTGTCGGC TTCGAGCTCC TCGCAAAAGT GTGGCGTCGC GCTAGGCTGC
 151 GGCGGAGCCT CTGTAAGGAA GGCGGGAGCT TGACAGCTTC AGGAAAGGCC  Exon 1
 201 CGTAGCGGTG ACAGCGACCC GGAGTCATGA GCGACAGCGG CGAGCAGAAC
 251 TACGGCGAGC GGgtaagcgc ggagttgcgc gggcggccgc ggtccccacc
 301 ctgctacttc ttctaggcct ctcggcccgg tgcagccggg tgtcgggagc
 351 ctgacgtgcg gagggagccg gggcgccgga gggcctggtg gccggcgctt
 401 ctcgtcggag ggaggccgcg ggcgggctgt gtgcctcgca cccgccacga
 451 ccgttttttt tttttttcct ttcccccgt tacggggcgg ggggaggcta
 501 aagatggccg cggcgtccgt cggcgttggg ggatgggaac ggtatcttct
 551 ttcgccgttg ctctcctgcg aagccgcgcc gcagccatct tgggctcgcg
 601 ggccgggcgc gctgccagag gcacaaaatg gcggagccgc cgctccctgc
 651 agccaggctt tgccgcctcg ccacccgggg tccaagggtg aagcggagaa
 701 aagccacgtg tggccgggag cctatgggga ctgactgatg cttttcggtt
 751 gatggagggc ctcctggtcc cggtaaggga cagctagctg taggggggctc
 801 ttggagcatc tggagacgga aacggctgag gggattggg ggccccgtta
 851 gttggagggc tttgtgctac agcgtttctc ccattgttga gagcttactg
 901 gaatagaacg caaggtcgtt aggcgttgtt gtatagagcc tccctacccc
 951 tgggggact tgggaaggag aaaccattgg cgacaattga tggcgctatt
1001 aaactctgaa gtcgacggga ttttattttt aagcttccac ctcccagagg
1051 gtgaaaatcg gtagaggttg attagattgt atacaatggg cctggactag
1101 acccagcccc aaagctgaac aaatgaggcg catgtggcgt ggctgtagag
1151 tttagattaa aaactgtcac gtgaagatgc ggaagtccag ggctcagtga
```

```
1201 acaggtaatt gcagtttgga aacggcttac aagcatcata agaatggctg
1251 ttttgccctt cctgtactaa cgtttttatt ttcgcaaaaa gttcacagga
1301 acacttaacc actagttcac agtttatttt tttggttagt aaactctaaa
1351 aggcctttga cggtttggta gagagcattc ttggacttcc atggtgaact
1401 tgaacccaaa aagagtaatt tgaacggatg taatctttta tatacggaga
1451 tgagtcccta agacaattta aagttcagtg tcaaccagtg cgtgcctttt
1501 acctaaggaa agaaagcgat gggggagtgg gacagaatgt tgtttttctg
1551 ataatggaga atgggaccta gtctcagtga tgggcaagcc cctactacta
1601 aactacatcc caacttgtaa gttcgtattg tttgagctcc taatttcacc
1651 cacatgtacc ttacgatgtt gagcctgcct tccgaagttg aagttagtct
1701 gtttagaatt aaaagcaaat agtttttgt tgttgctttg ggactaaata
1751 ggtatgcatc atcatacctg tggaaatttt tcctagtatt agctgtgggt
1801 cacattactc aagggagaaa aaaagcaatt gaatgaaagt gggtaccatt
1851 ttgaaagagc tgagaaattg ttactcctgt tagaggtttg gtttttttgt
1901 ttttagtaag atgcaccttc tggtgatttt caatatttga ggtagagtta
1951 ctctatgtcc ctgtcttgga acttagctct gtagaccagg ctagtctcaa
2001 ccccaggcgt ttgcctgcct ctgcctccct aatgctgtgg tttaaggtgt
2051 gaatcaacac atcctgctga cctgactact taattggaaa taattggggg
2101 gaaaaagtac taaaaatcga ctttctgatt tatttctaaa cttgaaagtt
2151 gtgtaatact taaactcaaa ttttttgttt ttagagactt tgttgtagct
2201 ctgcctgtat tgtatttacc tcaaatattg aggtaaactc aaattatgta
2251 taccaggctg gctggcttca aactcatgag attctcctgc ctctggtttc
2301 tgagtactga ggttaaaaac tcctggaggt gtgtgcacga tccccttttt
2351 gggccatgtg tacaattttg agctacctga tgtggtgggt agtggggcac
2401 aaaccctgct cttcctaaag tcagtaagta ctcttaactg ctgggccaat
2451 tctccagccc tgtttttaat ttaatttttt gcttttcaat tgaaatcttg
2501 ggatgagtgg aaaactgaaa catttagctg aacttttttc aagaaggctt
2551 gccaaaacaa aagttcagag atgaggttta aaaatacttc agggtaagct
2601 gggcagagtg ttgcaggttt gtaaatccta gctgcttatc ctggatagga
2651 ttcagagttc aagatatctg ggtaaattat ttagtaagac tgaacatttt
2701 cctccaaagg aataaggggt agtttaagga ctggttgtgt aactcagatt
```

2751 gcttgcctgc catgtagcct ccttatacac aaacatagca agaccagatc

2801 tgatgattat cagattcacc ctccctttta ttataagtgt aaaagtcatg

2851 ttcaaagtaa ttgccttaga tatgcctggt ataaccacct atctctggaa

2901 cctgaaaatg agtttcattg acttctagac ccttggagtt gataatgtac

2951 atggtataaa ttgttaagct ccctggaatc tcagtagtga ctacctctct

3001 tcctgtggac actgccacac ttctggattc cctcaaaccc tttaggcttt

3051 caaggttgtt tcctaaacag actgattgtg tgaaatagtg tttagtttgg

3101 tcacaaaatt tattggatgg atgttagctc cgttgcagta tgttctcatt

3151 ctttgctatc tgtagtattt attgagttga gtggtttttt tctgacttat

3201 tttaaagttg gtgtaattaa aatctcttct agtaattttt tttttttttt

3251 tttttttttt ttggaatttc aagacagggt ttctccatat agccctggct

3301 gtcctggatg gctgtcctgg aactcactct gtagaccagg ctgggcctcc

3351 aactcagaaa tccgcctgcc tctgcctccc aagtgctggg attaaagacg

3401 tgcaccaccg gcacctggct gcttctagta cttttaaatt attcattttg

3451 taaagcacct tttctttgaa ggaaaaacac tgccactcaa tgtaaagtaa

3501 tattggtgtt aatatttgaa aacccagtaa tagttccatt ataggctgtg

3551 aggcttttat tcattttgat ggtccactta gcataaaatt ctaacttctt

3601 tgagattgtg aatttgagtc tttgtcctga aaagccagaa actaaggatt

3651 gtacaagcta gataatttaa aatttttgtt aggctacttt atgactgtag

3701 tagccaagag gttaaagaaa agtttggaat tagcaaatat tgtggtacgg

3751 tagtagctgt gtagagagtg tgcttgaaac ataagccatc tgaatcaagt

3801 agtagcttcg ggacaccacc ccatccaatt gcctttcaaa ttctgcagtt

3851 tatctatcct gtgatagata cctttgtata ttccttgctt ttatccctta

3901 actctaaatt ctcgttttta aaactaaaac atttatttct aaaataattc

3951 tggctttaca cacagttttc attaacagag ggttcaatta atgtggcaag

4001 tttaagaaaa ttgtttgcat actttttca ttgctgacta gacaggtata

4051 agtctcttga aactggaatt gttttctttg gcttaaataa gaatgcctgt

4101 taatattgtg gctattgtta aaatagaaag tggtattttc aaggcgaagt

4151 tacaaatgat tttacaaggt aagtactact ggttttgctg aaaacttgaa

4201 gaggaatttg tcttgtttgt acagcctttt tttttttttt ccttttcagc

4251 aaaaccacaa acatgctaaa aatgaatact tttaaccttg actttgtaat

4301 ttggccaagt cattgattag agctatggtg tatgtgtcca gggttttatt

```
4351 gttaattagt atttatacac agctattgtt ttctaaggcg gcatggtgat
4401 tattttagaa attagtgcat ttacacagct tattattgta ggatgtgagc
4451 ctttatagaa ctaacttatc attgtttatc aggtcaaaat tgactagcaa
4501 cttatagtct ccaaatcatt gctttggagg ctattttcag gttacttact
4551 ggcatagatt ttcatgtgcc aatttggatg gggccctttt ctgcattaaa
4601 agtttttgtg cagccgggcg gtggtggcgc acgcctttag tcccagcact
4651 tgggaggcag aggcaggagg atttctgagt tccaggacag ccagggctat
4701 acagagaaac cctgtcttga aaaaccaaaa ccaaaagttt ttgtgcttag
4751 atagtggaaa gaagtttcta ataaaaaaaa catgtgcttt tgagagaaag
4801 aattgttacc aacataagtt taaagtttgg tatttttttgc aagtttataa
4851 aaagcagact ttacagctag tataggtatg tccctgtctc ccacccttttt
4901 tttttttttt tttttttttt ttttaaatta aagaaactac ttaagcattt
4951 gaagattttt ctcctccatc cttgtaatgc ttggagggga aaaaaagtag
5001 aagatgccag ggactactgc atttgggagg tggaggcagg aggattgggt
5051 gggtcatcta aagctttata gtgactttga tgccattctt ggctacatga
5101 gactggctcc caaaagccct ttattcattt ctatgctgat cttttctttc
5151 tgtagcaaag tggacttttt ctttgttcat ctcattttgt tattaaacta
                                    BamH I
5201 ctcccccagt aaagtgtttt tctaagtagg atcctttttc aaccaaatat
5251 gctagctcag tacttgatct tgtagtttta tgaagtggtt gcttcagttt
5301 agctgagctc aaataatcct aaatgcaaat attgtttagc agtgattttg
5351 ttcgagtata agagaaggct tggaaagcgg taatgaagca ataccaaagt
                                       Sac I
5401 ggcctgaatg ttgaaaagtc atggcaccta gagctctagt gtgtctgaat
5451 ctaagccctg tataggtaca taaaaataac ctttagggag gccaggcact
5501 aaggaaatgt gcttgggcat tctgattcca tgattacatt cgtgcttcca
5551 gtaaatatct cccattgcat tttagtgatg gatattacaa ggaaatgaat
5601 tattgtgact cccttaaata aaagccatta aaatgtttcc agattaaatg
5651 ataattgact ataaagttag gctggaaatt aggctttttc ttagttagaa
                  Nco I
5701 aagatactat agccatggtt gcctatacca aaaataattt tttttaaga
5751 aaaaaatttg tttagttttt accagaagaa aatgtaggag gaaatagtag
5801 catgcagaaa tatttagcag ggcaacaagg gaatttagac tgttacatgg
5851 acacttattt tgcttagtgt tccaacagtg ttccagtttg tattaaaaat
```

```
5901 tcacaaatat gctaaagtgt gggccttttt aataatttga gaagattaac
5951 tataactttc tcataaccaa cttttgaact aggatttctc ctttggacat
6001 cgagaagatt aatattttgt taatagaggg ggaaacttac agaattcttt
6051 ggacataacc actgttggaa tcaagtttgc tctgtttttc tttatagctg
6101 ttggcatgta atagttgatt aactttattt agtatcagga ttttagttct
6151 aaatttagta attaaattaa actcttagtt tcactaatgc agatttccca
6201 agggtgggtt gaacagatct ataggtttgc tgacattgtc taacaatgct
6251 gtttttaaat acacagtaat gtggcattaa atccatttcc ttatctagac
6301 aagtcacagt attgtaaacc tcttcaaccc cagcctttgt catcattgtg
6351 cagatgagtt gtccgtgctt ttctttcttg cacttttgta ctaaaatgtg
6401 tcattttttt gactagagat gtgcttttga cacgtagcat tttctcttta
6451 atacaataag aagtgtgaga tgtgatttac agtttgtaaa aatgttaaat
6501 gaacagtaaa tgttcagtgg cgcacttcac attcatgtta agcatgataa
6551 atttatttgg aatagacaaa tgattaccat ataccaacag gaaactatgt
6601 agtttcagtt ttttgagctg catatctagt atttttttaa tccaaaacta
6651 cgaaaaggga tttttttttc tagtttcagt tttggcactg gattttatcc
6701 tggagtttta aaatattctt catcctgttc tttttctatt aagGTTAATG
                                                          Exon 2
6751 TTGAAGAAGG AAAATGCGGA AGTCGTCATT TGACAAGTTT TATAAATGAG
6801 TATTTGAAGC TCAGGAATAA GTGAagctga aatttgaaaa aataaaagaa
6851 agaatgcatg ctaattatca gaccagaagt cccacttgta gaatattgag
6901 caatttgtgt gaagtgggga agatgaaaga agtcagaatt tgaaacggaa
6951 gaatgaagaa aagaaataaa aatgaagtta agataagaag taatctggaa
7001 tcagaaagca ctacgctaag taattactag tctgtttatg tgtccctgta
7051 tattttgcta aacatgcatg cattatttgt ttaatagaag aagtatatac
7101 agggtaaaga agtgacttcc aagggaatcg tttaaattag gtaataattc
7151 taattttaac tgcttagtca aatgatgaaa atgcaatttt taaaaacttt
                         Pst I       2569
                                ------------------→
7201 gtagttaaat agcaggctgc agcatcctgg gtaaatggcc tcccattttg
7251 ccttagggtt ttgatctatt gttctctgct ggttctgggg catgaatgag
7301 tatgagttgg aactggtggt cttcttaatg ccctttggac tctcaaaatg
7351 catgatattt tctgctttga tactgaacag tgtatagtag aattttctac
                                                          5'Sonde
7401 tggaaaaatc gaagattgtt accagggtga aaatgggact aaacccccca
7451 aatctaagca aagcatctaa caccattatt tatattgtga tgaaagcact
```

```
7501 aggttttcac aaatttgtgg aaagctatac cgcttaagtc caaatgttga
7551 gatctacaag tgccaaatga ggatgattct tttatattgt ttcagtttaa
7601 cgcctgttcc aactgaacta gggtttttgc tgaagtatat atagtagcgt
7651 cccttaaaag aaatgggtca gacaaatgaa atgagagcta attcaaagtg
7701 tgatagtagc tggtatttgt gtcttttatc tttagtttat tacaatgatt
7751 ttaaagtaaa tattgttttc ttctagtgtg ctactccaac tgaggaaaaa
7801 aaccacacag ttcctgtcta tgttttgact gattatatat agttaagtga
7851 ttagcataat gctaatacca agcacacaca atccacaaaa aaccaatagc
7901 tgtctttacc atgcagaata ttaaataaag attatcatct taaagctatg
                                                2316
                                                ←-------
7951 gcaaatttaa atttttctga agtgttaggt ctttagagct attgacaaaa
                                Nsi I           BamH I      2406
8001 atgaattaaa tgactgaagg atgcatgttg tgttgacact ttagcctatt   5'-Box
     --→
8051 gtcagtactt tttacattat ttctgtattt tgcaaagaga acacaatact
8101 ctcttatagg agacagttgc tttgtaaaac taataagata cttgagtggg
8151 tttttttttt tttttttttt tttgttacta ctcaagctta tatgattttg
8201 gaattttatt ctatagccca agttggatac acttaaagtg aaaataatgt
8251 tgatgttagt ataccttccc catctgttcc cccacccccc acacccttgg
8301 ttcttgtttc tccttcggac cattgagggt gatgctttta gattctattc
8351 acagggaaaa ctaaattaaa atcagggctg aaatggggtt tggaaccagg
8401 gaagattact ttttgaaaga atcatagaaa atatttaact tctaatattg
                                   3358→/2374←
8451 agtttgtgag gacttaaata gcatagtact agggtgccta acaagctaaa
8501 atctgtatat agagctttgt atgctgagct gctgttctct ataggagcta
8551 cagactgctt gagatttggt ttttaaactt gacctgttcc ttacaggttg
8601 tgcactagtt aaaatgatgg ctaagatttg agaacatttt tgtatttttt
8651 tctgggaatt tctggcattg ttttatttat gctttttcat tcatgatctc
8701 tttcctttca atacttgctc tccagagagc aattctttat agtttataat
8751 atatatatag ctttctcacg cagtcgaatt tgaaatttta tgtataaagg   KO-Sonde1
8801 attttcctag ctggaaaata gagttgtttg tgggttaagg tttaagatta
8851 gcatagagct ttggatttat ttagctaatc taactcgttt attcacataa
8901 aaatctttat ttttttcac caattaaagg tgttcaacat aactggaagg
8951 atttaacatc tttaaactct gatgggaacg tttagaagtg gtcttttgtt
                                            3359
                                 ←--------------------------
9001 gtccctaccc ccaccccacc ccttagtcca actaggtggc agtatacaga
```

```
 9051 cacgtgaaat cttttgtatt caggtgcttc ccctcatttc tcacataaaa
 9101 aatagttgct caagaagtac atctgtgaca tagcctttta tatagggagg
 9151 ctgagtggag ccttgggagc tttctaagcc atctgttaag acccctttat
 9201 tttagcctac tagaagttta aggagaaacc ttgctatggc taatttttca
 9251 tactagaaat tgtttttct ttgagcaaac agcaacagca agcctgaaag   KO-Sonde2
 9301 gagggaattt ttattttcta cctccttgtt cctaggcaaa tttctgttag
 9351 ccaaatttac tttttcttta agtaatctaa gaaagtaagg taaattgccg
 9401 tgatgaatat ttacttgaga atttgttaca gaaatccagg ggctggtaat
                         ←--------------3360----------------
 9451 tggagtagtc tccctccagc ccaatgaaag ttaaactgta tcttggtatt
 9501 aaaagcagct gttctctcaa acagtttgtc actccttggg gattaaggaa
 9551 ggtctgatag aaaggtgatg ctgtctctga catgtcatca cacttgtgtt
 9601 tttgtgtcat tcaggtattt tctaggtgat ttggggcctt gaaagctgaa
 9651 ctcattcctc tagtggtcta tatctgtttt acttgaggtc tcctctcttc
 9701 tgtattgtat acaaaaatac atgtttttat gtcctgagta cagagggagg
 9751 gatgttgtaa attgtccccc tcattctgta tgtaaattgc ttctgtatct
 9801 ttattccttt ttgagaatgg ccacactatt ctcaagggag agctgttgtg
 9851 gtttagattc atgtcctttg tttagttggg ctctaaaatg ttttgtggtt
 9901 aaagcttaac tgtcaaggag agttagtact gtctactcat taagagttat
 9951 tttttaaaa atggctttgt agaatttttc ttagcattct gttgctaaat
10001 gtattttttt tctattaatt aacacagcct ttggtttatg aaatggttat
10051 cctgtttagc catttcttca tcccccсttt ttttgagatt tcatttgtgt
10101 tggttaattg gcagttagtt ggagtcttga cagaaaaaca agtgcataat
10151 atttgcctag gcatctttag atttgtcttc tgggctccta gacaatgagc
10201 tgcttctgat tttacccttg tgtgaatgtg cctttgacat agcatttcta
10251 ctttttctca gttacttgtg ttctgtcttg gttcttgtcg gtttagtcaa
10301 taaaactata tcttggctac cctcttttct taagactgtt gctgcctttc
10351 tctgttctta gctccttcag gttgctcttg agttttgtaa gaggtcccca
10401 caaacactaa aagcaagaat ctagctagat ttcttctaac ttcagagctt
10451 gaaactcaag attatcctta ctgcttttgc ccctcattca acaaacttta
                                                 -----------
10501 atttgaaatt ttataaattt tatagggtgc tttcattgct tctggagcag
      -----------3240----------→
10551 aataaatttc aaagttcaag ttcattctta gtttatgtag tattagtctc
10601 caaatccttg ggcagttctt taacagtcag acttgggaca ccttttaagg
```

10651 ctgtggagtt agatacttct tatttctgct ccagaaaggt ggaagaaaaa

10701 accaattgat tcatgtcagt tgaagcaatg aaaccattat accaggtatc

10751 ctcaattctg ccctcactta tgttttctta ttttggaaga ggattgctct

10801 ccttggccat ttatctcaca gaagcttatt tgtttttaaa gtttccaaaa

10851 cagtatacaa attaaaactt ttgacatctg cgtgtagGAA TCCCGTTCTG

10901 CTTCCCGAAG TGGAAGTGCT CACGGATCGG GGAAATCTGC ACGGCATACA Exon 3

3482

10951 CCTGCAAGGT CTCGCTCCAA GGAAGACTCA AGGCGTTCTA GATCAAAGTC

11001 CAGGTCCAGG TCTGAATCTA Ggtaagaaag gccattttga taactcttca

2507→/2395←

11051 ttaactctgc tgatatatgg tataattgat aaagtagtga aggtctgtta

11101 ccctactttt gctgatttaa ccttttgaac gtaagatgct tgcagcacca

2407 BamH I SalI 2339

11151 gcactcctct ctcaatgtgt tgtggtttag gtgaccactt tatacagagg KO-Region

11201 taaacactct agtcaaaagc caggaatgtt actaaaaata aaccacttgt

11251 gatggcctaa attagtgggc atattaggaa atacacaata aaggatagca

11301 ttgtgagacg taaaggtgtg atgaacccaa ctaggagtgt gccttgtggt

11351 ccaattttca aaagaatttt aagtaatttt aacatagtat ctgttactta

11401 gttataactc caaagacttc tgttttacat tcagGTCTAG ATCCAGAAGA

11451 AGTTCTAGAA GGCATTATAC AAGGTCACGA TCACGATCTC GCTCGCATAG

Exon 4

11501 ACGATCCCGG AGCAGGTCTT ACAGCCGAGA TTATCGCAGG CGCCACAGCC

11551 ACAGCCATTC TCCCATGTCT ACTCGAAGGC GTCATGTTGG GAACCGGgta

11601 agatttctga agtgctatgg gctgtatgcg cactaggcaa aaaagcattc

11651 taccactgag gtacagtgcc cccagtctga agactatttt agaaccttgt

11701 actggctgat ctttgttttg acagtggagt tttagtaact tgagtattta

2340

11751 tattgggatt tactttccct actaagtcag attgtcctct cgtgccctct

Sal I Xho I-Nco I 2341 3487

11801 cccatgtaaa attactggaa ccttttgaca ttcattttg tttgaaacat 3'-Box

3263

11851 ttgtaatatg ggggttgaat tttactgata ctagctgttt aatttgttaa

11901 attttctggt ggatttcatc tatgatcaaa atatacaata taatttccct

11951 ctctgacttt agctgctaga cattcagaag gaataatgga aaagcatatg

12001 aataatttat aaagcttaat gtttgcttca tctttacttc ttgctccaca

12051 ctattaccct catagcaaca ttactgtttt taatcttaat gtgcttaatt

12101 tgcaaattaa gttttacaat atctctgacc acttaaaata gtcaaacata

12151 ataatcttta agcagttgtt acatatgttg tgcagttctt gttctatgta

```
12201 gatcagcatg cctgtgtctt ctgagtgttg ggatataggt atgtgccacc
12251 accacccagc tggttcccat tttaagacaa tgtttcactg tagtgtgtca
                                  2619
                         -------------------------------→
12301 ctcttgttgt cctgaaactc acagggttaa ctaggttgac ctctaactaa
12351 aagatccact tgtttcttgc tcaatgatgg aataaaagtg tgtatgacta
12401 tacccagctc aagttttatt ttttatcacc tttttgaggt gggtatctgc
12451 tacatacatt gaagtcagaa ccaacttgaa tgggttggtt tgtcaagcta
12501 gaaaggtaaa agcaaaggcc tttactcatt gagctatgat tctgttggtg
12551 ggaattgagt tgtgtagtgg ctaactgtag attgaagatt gctgtgagtt
12601 ttgggtcagt ctgagttgtg tgatctctga actaaataaa tggtccgtgc
12651 tttttttctc cccctcttga tggggattgt gctgctctga tttatgcctg
12701 cttggtgtaa ttatttttcc ccttagaata aattcctaga tgaatatcat
12751 ctgagctgaa cttcaaaacc caaaatcaga ctgttagatt tctttttata
12801 agactcttaa taaccctctc ctccctgttt taatgttgga tttagttctc
12851 ttgtggggtt tctttttttt tttttaagat ttatttactt attatatgta
12901 agtatactgt agctgtcttc agaaacccca gaagagggca tcagatctca
12951 ttacagatgg ttgcaagcca ccacgtggtt gctgggattt gaactcagga
13001 cctctggaag agcagtcagt gctcttaacc actgagccat tctccagccc
13051 tcttgtgggg tttcttaccc tttgatgatt atactgtatg tatgcctcaa
                          2402
            ---------------------------------→
13101 tgttttgtaa gatacagtgg tgcttgatct aatcatttat ctttttttct
13151 atactagtta gatttatgtt agattctcaa ggattaaaaa tctcctttgt
13201 gttttctagG CAAATCCTGA CCCCAACTGT TGTCTTGGCG TGTTTGGGTT
13251 GAGCTTATAC ACCACAGAAA GAGACCTAAG AGAAGTGTTC TCTAAATATG   Exon 5
13301 GCCCCATTGC TGATGTGTCT ATTGTATATG ACCAGCAATC TAGACGTTCA
13351 AGAGGATTTG CCTTTGTATA TTTTGAAAAT GTAGACGATG CCAAGGAAgt
13401 aagtaaattc ttactttcac tttagttaaa aacaccaatc ttgttgttaa
13451 ctgttctgat aaccaagtga ttgacaaggt aatgtcttgt ttcatagtat
13501 aaatttaaga tctaagacat gcatctatag attagagtca aaagaaacta
13551 tttctgcccg gcggtggtgc cgcacacctt tttttttttt tttttttttt
13601 tttttttttt tttttttaa agatatatgt aaatacactg tagctgtctt
13651 cacacactcc agaagaggga gtcagatctc gttactgatg gttgtgagcc
13701 accatgtggt tgctgggatt tgaactctgg accttcagaa gagcagtcgg
13751 gtgctcttac ccactgagcc atctcaccag cccaccacac acctttaatc
```

```
13801 ccagcacttg ggaggcagag ggaggtggat ttctgagttc gaggacagcc
13851 agggctacac acagactcga aaaaccaaaa aaaaaaagaa gaagaaacta
13901 tttctacttg gaatgtgtta agttcattga tattctgaag ttattcttaa
13951 cctgtgcaaa attacatgcc aatgaagtgt gactccgggc atttaattag
14001 tcttgaagct aatttaatta atctgtactc ttacattatt ttgaagtaaa
14051 ttctaaacct atgatttgcc gtccctgtaa tgctgtgttg atacataaac
14101 catgaagttt gataaactgt tttgataagt ttggtaaagc atacactgag
14151 cttttttttt tttttttttt tttcttttat gttgaacttt ttacttgact
14201 cagtagaaag tgagaatgtg attatctgtt tagtaatgtg caactttaca
14251 ttttagactc attagtgtaa aaagagagca agctaataac aggtccattg
14301 attattgttg agacctggaa ttaagctaga attttaatac actaattctt
14351 catgaaattg ggagttctca aaaatttttt ttagaagtta gatgtaaata
14401 attataaaaa tgacattaaa tttttaaata aaattcaaaa agaaccttct
14451 aatatgccaa aagatgtaag atacgggtaa taaaattgac agtgccagca
14501 ttttgtattt gtaagcctgt atttgtcttt gtatagagct acaacttaaa
14551 aacagcctta aactcaaaga taaatcaagc cttttcataa aggcttttgg
14601 ctcccacaac aggcgttttg aatcatacaa tgtcagagac aatttttctt
14651 ctaattccaa acagccatgt gtgaagggga gcatttgggc ttatttaatt
14701 agcaagtgct aatttatgaa aaattagaat ttgggtttca taagtattag
14751 tgtgctgtgc gtgtgtataa tcccagcatt taggatgtta gagatcaagg
14801 gtttagctaa agtccatcta aatttgtaga tagctatttt gtgggtcatg
                                               --------2403--------
14851 taggctgata ccgtggtctg catacttttt tatttttgtg gtaaatttgt
      -----------→
14901 agtacacaga aaaacattta taaattgtgg gggtggtttt tttttttcct
14951 ggccaaaaaa tagctatgcg gtaattaaat atattgtcca ggatgtttgt
15001 aacaattatt tttatctttt gaagGCTAAA GAACGTGCCA ATGGAATGGA   Exon 6
15051 GCTTGATGGG CGTCGAATTA GAGTCGATTT CTCTATAACA AAAAGGCCCC
15101 ATACCCCAAC ACCAGGAATT TATATGGGGA GACCCACTTA gtaagtaact
15151 tctttgtgtg taagaatggg tgggtacttg aggcacagtg ttgggtatct
15201 ttctctatca cggtccatcc cctacccccc catctcgtga catcttttta
15251 aaagaaatgg ttaaatactg tatacatgca ctaccgcatg tatgtaagat
15301 tgtggaggcg agttcttcct tacgctttta tgaggggtct ggagcgaaca
```

15351 tgctccacac gtgttcctgc ctcccattct cgggtcctct ttctttttct

15401 tttccctttt taaaaatatc catatgcttc atgactgtgt agccatctgc

15451 tggatcatgc tcaacctact atgctttaca ccttcctaaa taacctgctc

15501 ttcaccacca gcagccatca gctgcataga gctggttcct taggtagggg

15551 aggggcctcc ttaggtaggg aacatcccct cacccccaaa tgctggaatg

Pst I

15601 ttaattgata caggtaacta aactgcagct accattagtt ctagagtgca

15651 atctgtagct ttagaatctt tctcctgttt tcctgatgtt tgagtttgga

15701 gtgggggatc attcaatatt gatgtcccgt ttatggttga acacactcct

15751 acacacttag tctgctgtcc aatgccaaaa gaagcttctt ttggtgtact

15801 gggttgctcc aaatcatggt cccagcttca agtttttgtt tttgtaaaag

15851 atttatttta tttatatgag tatactgtag ctttcttcac acactccaga

15901 agagggcatc agatctcatt atggatggtt gtaagtcacc atgtggttgt

15951 tgggatttga actcaggacc tctggaagag cagtcagtgc tcttaaatgc

16001 tgagtcatct ctccagaccc ccagcttcaa gttttgaaag agtgtttcag

16051 tgaatctaga gtttactgac tggctgcagt gagcttctgt gaccttcctg

16101 tatgtcacta tacattatgt tggtgccagt gacctatttc agacctcata

16151 cttaagcagt agtttactga ttgattcatc ttcagaacct ctaaatacaa

16201 tttattctta gaaatcgtga gggggccggg cggttggtgg tgcacacctt

16251 taatcccagc acttgggagg cagaggcagg cggatttctg agttccagga

16301 cagccagggc tacacagaga aaccctgtct ccaaaatcaa aaaaaaaaag

16351 tgaggggatg ggttcaatcg cagatgttaa agaacatctt actcacttaa

16401 gtctcagctt caaatcaatt tttttttga ggtagggtat taatggagcc

16451 tttattccca gcacttggga ggcagaggca agcagggcca cagagtgaaa

2393

16501 actgtctcaa aacaacagca acaaaacaaa ggcagaatcc ttaccataca

16551 acctgagcta ctctcaaact caccttgtgt gccaccgccc agcagttggt

16601 tgacttttaa tacaaactca gttgaatatg tgtactccta aaattttcag

16651 aacattgcac aggaatatac acataaagtg tagcgaggga aaagaaaagg

16701 tagtattaat actaaagagg tctattagac atctctagtt tttgtgcagg

16751 aaaaccaaag agacatttgc ttaatcatat ccaaggtact aggttgaatt

16801 gagttctctt ctgtctgtga agacatattt tagcaagagg gagactaaag

16851 atagaatgtt gtcgcttaca gTGGCAGTTC TCGCCGCCGA GACTATTATG Exon 7

16901 ACAGAGGGTA CGATCGGGGT TATGATGACC GGGACTATTA CAGCAGATCA

```
                                                           2342
                                                   ←---------------------
16951 TACAGgtgag tcagttcaca ctgaaagcac tgcaaaagct aagctctctt
      ---------           2317
                ----------------------------→
17001 agaatgtaag aaatagccgg gacttagggc aaaatttaat agttaggtct
17051 aattggatat gtagttggat gcctggttgg ttagctttta aagataaatg
17101 aagaaaaact tagctaagag aggtgaaact taattttttt ctgttactgt
17151 atggccaaca gtaattctaa acctttagtg taaacttaag tatgggtcac
                                                              3'-Sonde
17201 aactcttggc ttaattcatt gatttggtat tttcatgttc aagatatgga
17251 caattgttca tgaactcttt cctgtggaag taagtctcta ataagtccag
17301 acttctacca aaatggcatt tccctacccc aatagtcatt cctgtgtttc
17351 gtggtactta ggactgagaa gttaaaggtc tttattgaga gcaactgtgt
17401 tatttcagaa agggctcttt atcatgttaa ctataagaaa attgggtttt
                                                     2591
                                                ←-----------------
17451 gtcctttgtt gtggtgattg tttcaactaa acaatttact ccttttctg
      --------------
17501 tctttacagA GGAGGAGGTG GTGGAGGAGG TGGATGGAGA GCAGCTCAAG  Exon 8
17551 ACAGGGATCA GATTTACAGg tgtgctaaag ggttttaagt ctggatacag
17601 tagaatgctg gtaaaaaatg tttgcctgaa tcttagtagc tttcctctta
17651 gtggcaaaac aggttttgag acagggaggg tcctggaact cagagatctg
17701 tctgcttcta tttcccaagt gctggggtta aagacgtgcc ctatcatatc
17751 tggctattta tttatttatt tatttagatt tatttattgg ttatatgtaa
17801 gtacactgta gctgtcttca gacactccag aagagagagt cagatctcgt
17851 tacggatggt tgtgagccac catgtggttg ctgggatttg aactctggac
17901 cttcagaaga acagtcgggt gctcttaccc actgagccat ctcaccggcc
17951 ctttattttt taaagattga tttatttctg tattttgcct gtatttattt
18001 ctacattcat acttggatgt atccttggag gacagaagag ggtttccaca
18051 tttgtgagcc agccttttag gtgctgggaa tcaaagtgct agggcagcca
                                              Nco I
18101 ttgctctttg ctgttaccca cctctctcta gccatggat ttgatttctt
18151 aaagtttgca aaagtagttt tcaagccggg cgtggtggtg cacgccttta
18201 ataccagcac tcggaggcag aggccggcca gggctacaca gagaaaccct
18251 gtctcaaaaa accaaaaaat aaaaataaaa agtagttttc aataggcagt
18301 gaaaagggct ttgtagaaac tgcaaattaa ttgagcttac aagagataat
18351 tagttgatag caacattttt tagatagtac attttttaag ttttgaatca
18401 cgtggagaat catgtttaaa gctttctgct tgctaggtcc atgagctctt
18451 aagttttgtg ttcttaattt acataagaaa gtgaatatag aaaactaaag
```

18501 gttatccatc agtggatttt cttttggctg ttcatgaaaa tggcttgaat

18551 aaatggtgtt ttttgttgtg gaacattatt aaaagtaaaa agatacttgt

18601 aatgtttatt tggtatttga acctaatata ttacatttta aaagttgatc

18651 aaaatctttt agtttgggac ctggcaaaag ttaggctttg ttattagccc

18701 agtatcatac agatgtagat gcaatctaaa ttttttttaca gAAGACGGTC

Exon 9

18751 ACCTTCTCCT TACTACAGTC GTGGAGGATA CAGGTCACGT TCTCGATCAC

18801 GATCCTACTC ACCTCgtaag ttaccttgat gggttttatc tcttgtaata

18851 tgatgtgctg aagtataact ataactgtct tgtaactttg caagtccatg

18901 ctgttccagc ccagctggct atgtctgcaa acagtttcat ctgtgctatg

18951 tgaatggttt aaatataagc ttactaaata gaatttttat ttcttaagca

19001 tttataaact aatctagtat taatgcttga gtgagactct tactcatggg

19051 agagattttt ttttcaggtt atagaaaaaa gaaacctccc atttttaata

19101 tgggggtttt tttttttttt tttttttttc cattttagGT CGCTACTAAA Exon 10

19151 GCATGAAGTT GAAGACTTTC TGAAACCTGC CATAGAGCTG GGATATTGTT

19201 TGTGGACAAT ATTTTCTATT GTCTCCTGTT TAAAAAGTGA ACAGTGCCTA

19251 GTGAAGTTAG GTGACTTTTA CACCTTTTAT GATGACTACT TTTGGTGGAG

19301 TTGAAATGCT GTTTTCATTC TGCATTTGTG TAGTTCGGTG CTTTGTTCAA

19351 AGTTAAGTGT TTTCAGAAAA GTATGTTTTG CATGTATTTT TTTACAGTCC

19401 AAATTTTGAC TGCTGAGAAG TTTCTATTGT AAAAAACTTC ATTTAAAAGG

19451 TTTTTCTACT GAATCCAGGG TATTCTGAAG ATCGAAGCCT GTGTGTAAAA

19501 TGCTACCAGA TGGCAAAAAG CAACAATAAA CAAGTTTGAT TTTTACTTTT

19551 CTTTCTAAAT ATCAATGCTT AACCAGAACC ATTcTTaAGT TATCAGTAAA

19601 AAAGTAAAAA GTTAAATAAA TGTCTTTCAG GAGTCCATGA AACTTGCCAT

19651 ATTCAATATA CCTGCGATTA AGTGTTAAAA AATACGCTGT AACTCTGTAC

19701 TGCTAGTATT AGAACAAAcA CTCTTCCCAT ACAGCAAATG CTTAATGCTT

19751 ACATTAATGT GGATGTGTCG GCCTTTATGT AATCTGTATT ATATATAGCA

19801 GGGAATAAGA GCTACAGATA CATGCCTTTA AAGGGCTGTT TCTTAAGGCT

19851 GTTACAAGGA GATAATGGTA TTtCAAcTAA TTATCAGCAA GTGACAATAC

19901 ATTCCACCAC AGATGGACTC TtgttctTCT AGCGtTTAGA CTATATGAAA

19951 ATACTGGGTG CTTCAAAGTA TGGAAGGAGC GAAGGGATCA TCAAACCTTG

20001 TCATGGATGA AGACTGCCTG TTCATTTTTT AAATATGATT TTCAGGTCCT

20051 TTGCTTACCA AAGGAGGCCC AA

8.5 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Humangenetik der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn begonnen und am Institut für Humangenetik der Universität zu Köln fortgeführt. Der Betreuerin meiner Arbeit, Frau Prof. Dr. Brunhilde Wirth, möchte ich für ihre stete Diskussionsbereitschaft und ihre wertvollen Anregungen danken, die maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. Thomas Wiehe danke ich für die Übernahme des Koreferats und Herrn Prof. Dr. Hartmut Arndt für die Übernahme des Vorsitzes der Prüfungskomission.

Ich bedanke mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Humangenetik für das angenehme Arbeitsklima und die kollegiale Zusammenarbeit. Ein besonderer Dank gilt allen Mitarbeitern und „Ehemaligen“ der „SMA-Gruppe“: Bastian Ackermann, Lars Brichta, Stephanie Friedrichs, Lutz Garbes, Irmgard Hölker, Miriam Jakubik, Sandra Kröber, Regine Karg, Gabriela Oprea, Markus Rießland, Frank Schoenen und Maike Warnstedt. Mein besonderer Dank gilt hierbei Miriam für die exzellente Zusammenarbeit, für ihre kollegialen Unterstützung und ihren freundschaftlichen Beistand. Ein großes Dankeschön auch an Markus für seine stete Hilfsbereitschaft. Danke an Irmgard für die Hilfe im Rahmen des Hb9-Projektes. Vielen Dank an Basti, Lars, Lutz und Frank für viele hilfreiche Diskussionen, Tipps und Ratschläge.

Ich möchte mich bei der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Michael Sendtner, Institut für klinische Neurobiologie, Würzburg, und insbesondere bei Dr. Sibylle Jablonka für die Kollaboration bezüglich des *SFRS10*-Trangenen Projekts bedanken.

Mein Dank gilt Dr. Thorsten Buch, der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Brüning und der von Prof. Dr. Pasparakis für die Kollaborationen im Rahmen der Mausprojekte. Insbesondere gilt mein Dank hierbei auch Saskia Hemmers, Dr. André Kleinridders, Siegrid Irlenbusch und Dr. Ralf Gareus für die stetige Unterstützung, Ratschläge und Hilfe bezüglich dieser Projekte.

Bei der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Schröder, Institut für Anatomie des Universitätsklinikum Köln, und insbesondere bei Herrn Dr. Köhler möchte ich mich für die Zusammenarbeit bei den immunhistologischen Untersuchungen bedanken.

Vielen Dank an Herrn Dr. Sebastian Bäumer, Klinik und Poliklinik für Neurologie des Universitätsklinikums Münster, für die hilfreichen Diskussionen und für sein freundschaftliches Engagement.

An dieser Stelle sei all den „helfenden Händen“ und „guten Geistern“ des Zentrums für Maus-Genetik, im Tierstall und in der Genetik der Universität zu Köln gedankt: Dr. Anne Plück, Pia Scholl, Tanja Tropartz, Sonja Becker, Agathe Stark, Bernadette Hartmann, Kerstin Marohl,

Mira Lichtenberg, unseren Spülfrauen Frau Schmitz, Frau Bläser und Viktoria Rivkin, unserem „Werkstattmeister Horst Dieter Linnig und unserem Hausmeister Ramdane Bouchequif.
Für die sorgfältigen Korrekturen an meinem Manuskript danke ich Miri, Markus, meinem Vater und Frank. Vielen Dank an Karin Boß und Sandra Krüger für ihre Hilfestellungen im Umgang mit den „Word-Tücken“ und für Ihre kollegiale Unterstützung.
Ich danke Uli, Regine, Kristin und den „MDCCs“ – Ihr habt mir in so mancher „Schaffenskrise“ beigestanden.
Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, meinem Bruder Björn und Frank. Ich danke Euch für Eure unermüdliche und liebevolle Unterstützung.

8.6 Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbstständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen –, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie – abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist, sowie dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen der Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Frau Prof. Dr. Brunhilde Wirth und von Herrn Prof. Dr. Thomas Wiehe betreut worden.

Teilpublikationen liegen in Form von gedruckten Posterbeiträgen (siehe 6.1) vor.

Köln, im August 2008 Ylva Christine Mende

8.7 Lebenslauf

Name:	Mende
Vorname:	Ylva Christine
Geburtsdatum:	15.05.1977
Geburtsort:	Köln
Adresse:	Rothehausstraße 48, 50823 Köln
Familienstand:	ledig
Staatsangehörigkeit:	deutsch

Schulausbildung

1983-1987:	katholische Grundschule Forststraße, Köln-Rath
1987-1996	Heinrich-Heine-Gymnasium, Köln-Ostheim
1996	Abitur

Studium:

1996-2001	Studium der Biologie an der Universität zu Köln
März 1999	Vordiplom
Dezember 2001	Diplomprüfung (Hauptfach: Genetik; Nebenfächer: Entwicklungsbiologie, Biochemie)
2002-2003	Diplomarbeit: Arbeitsgruppe Herr Prof. Dr. Walter Doerfler (medizinische Genetik/Virologie; Institut für Genetik der Universität zu Köln)
2003-2004	Dissertation: Arbeitsgruppe Frau Prof. Dr. Brunhilde Wirth (Institut für Humangenetik der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn)
2004-2008	Dissertation: Arbeitsgruppe Frau Prof. Dr. Brunhilde Wirth (Institut für Humangenetik der Universität zu Köln)